

Aus dem Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institut  
und der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen  
Fakultät der Universität Leipzig  
und  
der Klinik für Wiederkäuer der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

**Trächtigkeitsdiagnostik bei Neuweltkameliden mittels nicht invasiver Methoden**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von

Janine Volkery  
aus Unna

Leipzig, 2013

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Professor Dr. Almuth Einspanier  
Professor Dr. Axel Sobiraj  
Professor Dr. Thomas Wittek

Gutachter: Professor Dr. Almuth Einspanier, Veterinär-Physiologisch-Chemisches  
Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Leipzig  
Professor Dr. Axel Sobiraj, Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik,  
Veterinärmedizinische Fakultät, Leipzig  
Professor Dr. Thomas Wittek, Klinik für Wiederkäuer, Veterinärmedizinischen  
Universität, Wien, Österreich.  
Professor Dr. Patrik Zanolari, Wiederkäuerklinik, Universität Bern,  
Schweiz.

Tag der Verteidigung: 23.04.2013

**Meiner Familie**

## INHALTSVERZEICHNIS

## INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	1
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	2
2.1	Taxonomie, Vorkommen und Domestikation von Neuweltkameliden.....	2
2.2	Weibliche Reproduktion.....	4
2.3	Endokrinologie der Trächtigkeit .....	5
2.4	Trächtigkeitsdiagnostik .....	6
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	9
3.1	Publikation 1: „Trächtigkeitsdiagnostik beim Alpaka mittels Bestimmung von Progesteron und Pregnanediol-Glucuronid in Speichel, Milch und Urin.“ .....	9
3.2	Publikation 2: “Progesterone, pregnanediol-3-glucuronid, relaxin and oestrone sulphate concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas ( <i>Vicugna pacos</i> ) and their application in pregnancy diagnosis.” ..	16
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	22
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	26
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	28
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	30
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	I
8.1	Abstract zu einem Poster, vorgestellt auf der 17. Jahrestagung der DVG-FG InnLab vom 31.01 – 01.02.2009 in Berlin, sowie der 42. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung vom 26.-27.02.2009 in Leipzig .....	I
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	II

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
Cr	Creatinine
e. g.	for example
E1S	Östronsulfat
EIA	Enzymimmunoassay
Fig.	Figure
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormone
Krea	Kreatinin
LH	Luteinisierendes Hormon
m	Meter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n. Chr.	nach Christus
ng	Nanogramm
NWK	Neuweltkameliden
P4	Progesteron
PdG	Pregnanediol-Glucuronid
PGF <sub>2a</sub>	Prostaglandin F2a
RLN	Relaxin (neu)
RLX	Relaxin (alt)
SAC	South American camelids
se	standard error
SEM	Standardfehler
Std.	Stunde (Stunden)
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
v. Chr.	vor Christus
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent

## 1 EINLEITUNG

Zu den Neuweltkameliden (NWK) zählen die Wildformen Guanako und Vikunja sowie die domestizierten Arten Lama und Alpaka. Neben ihrem Ursprungsgebiet in Südamerika gibt es größere Populationen u. a. in den USA, Australien, Neuseeland, Großbritannien und Frankreich. Wurden in Deutschland Lamas und Alpakas bis vor ca. 20 Jahren noch nahezu ausschließlich in Zoos in geringer Zahl gehalten, so geht man heute von ca. 9000 Tieren aus (Dr. Thomas Wittek, Wien 2012, persönliche Mitteilung), die überwiegend von privaten Züchtern in kleinen Herden gehalten werden. Neben der Haltung als Liebhaber- und Hobbytier nimmt dabei die professionelle Haltung im Haupt- oder Nebenerwerb immer mehr zu. Hauptaugenmerk liegt hier auf dem Im- und Export von Zuchttieren, in der Wollproduktion (Alpaka), sowie im Tourismus, da v. a. Lamas bei Trekkingtouren genutzt werden.

NWK zeigen einige reproduktionsphysiologische Besonderheiten, die sie von anderen Haussäugetieren wie Wiederkäuern und Pferdeartigen unterscheiden. So zeigen sie z. B. keinen Brunstzyklus, sondern der Eisprung erfolgt als provozierte Ovulation durch den Deckakt (FOWLER und BRAVO 1998). Die Bedeckung der Stuten findet weitestgehend im Natursprung statt, häufig außerhalb der eigenen Herde, da entweder kein eigener Zuchthengst zur Verfügung steht oder aber die Anpaarung aus züchterischen Gründen unerwünscht ist.

Biotechniken, wie die künstliche Besamung, haben in den letzten Jahren zwar einige Fortschritte erfahren, spielen aufgrund von Schwierigkeiten bei der Spermagewinnung und -konservierung bei NWK aber noch eine untergeordnete Rolle (ADAMS 2009).

Derzeit erfolgt die Trächtigkeitsuntersuchung in der Praxis durch Kontrolle des Paarungsverhaltens mit dem Hengst, der Bestimmung von Progesteron (P4) im Blut sowie der Ultraschalluntersuchung. Während der Verlauf der Konzentrationen von P4, Östronsulfat (E1S) und Relaxin (RLN) im Blut von NWK bereits wissenschaftlich untersucht wurde, gibt es keine oder nur auszugsweise Erkenntnisse zu den Konzentrationen in Milch, Speichel und Urin (u. a. ABA et al. 1995; BRAVO et al. 1996; FOWLER und BRAVO 1998).

Die Nutzung von nicht invasiv gewinnbaren Medien wie Milch, Speichel und Urin würde die Trächtigkeitsdiagnostik in der Praxis deutlich vereinfachen: Der Besitzer kann das Probenmaterial selbst gewinnen, was nicht nur eine Kostenersparnis bedeutet, sondern auch den Verkehr von Fremden im Betrieb reduziert. Dadurch und durch den Wegfall der invasiven Blutentnahme wird die Stressbelastung für eine Stute deutlich vermindert.

Zielstellung dieser Arbeit war es daher, die Konzentrationen von P4, seinem Metaboliten Pregnanediol-Glucuronid (PdG) sowie RLN und E1S in Speichel, Milch und Urin

## LITERATURÜBERSICHT

von Alpakas im Vergleich zur jeweiligen Blutkonzentration zu bestimmen, mit dem Ziel ihre Eignung zur nicht-invasiven Trächtigkeitsdiagnostik zu untersuchen.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Taxonomie, Vorkommen und Domestikation von Neuweltkameliden

Die NWK gehören zusammen mit den Altweltkameliden zur Unterordnung der Schwielensohler (Tylopoda), der Ordnung der Paarhufer (Artiodactyla), der Familie der Kamelartigen (Camelidae) und der Klasse der Säugetiere (Mammalia) (s. Abbildung 1). Zu ihnen zählen die domestizierten Formen Lama (*Lama glama*, Linne 1758) und Alpaka (*Lama pacos*, Linne 1758), sowie die Wildformen Vikunja (*Vicugna vicugna*, Molina 1782) und Guanako (*Lama guanacoe*, Müller 1776) (HIENDLEDER und KESSLER 2002).

**Klasse:** Säugetiere (Mammalia)  
**Familie:** Kamelartige (Camelidae)  
**Ordnung:** Paarhufer (Artiodactyla)  
**Unterordnung:** Schwielensohler (Tylopoda)  
**Gattung:** Altweltkameliden (*Camelus*)  
Trampeltier (*Camelus bactrianus*)  
Dromedar (*Camelus dromedarius*)  
**Gattung:** *Neuweltkameliden* (*Lama*)  
Wildformen  
Guanako (*Lama guanicoe*)  
Vikunja (*Vicugna vicugna*)  
Domestizierte Formen  
*Lama* (*Lama glama*)  
*Alpaka* (*Lama pacos*)

**Abbildung 1:** Übersicht taxonomische Einordnung von Neuweltkameliden

Die Evolution der Kameliden begann vor ungefähr 40 Millionen Jahren in Nordamerika; von dort gelangten ihre Vorfahren vor ca. 3 Millionen Jahren über die noch vorhandenen Landbrücken nach Asien und Südamerika. Abgesehen von den Größenunterschieden haben alle Kameliden eine ähnliche Anatomie und Physiologie. Sie besitzen ein komplexes, dreiteiliges Vormagensystem, das jedoch einige anatomische und physiologische Unterschiede zum Wiederkäuer aufweist (FOWLER 1997). Die beiden Unterordnungen trennten sich bereits vor 40 Millionen Jahren und entwickelten sich paral-

## LITERATURÜBERSICHT

lei zueinander. Kameliden regurgitieren und kauen wieder ebenso wie echte Ruminanten, sind aber effizienter in der Ausnutzung von Protein und Energie aus Futter minderer Qualität (FOWLER 1998).

Die Abstammung des Lamas vom Guanako gilt aufgrund von morphologischen und ethologischen Ähnlichkeiten als gesichert. Die Herkunft des Alpakas dagegen ist umstritten, da es anhand seines Zahntyps eine Zwischenstellung zwischen Vikunja und Lama / Guanako einnimmt (HIENDLEDER und KESSLER 2002). Neuere molekulargenetische Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass das Alpaka aus dem Vikunja entstanden ist, weswegen auch eine Umbenennung von *Lama pacos* in *Vicugna pacos* diskutiert wird (MARIN et al. 2007). Alle Kreuzungen zwischen den verschiedenen NWK bringen fertile Nachkommen hervor.

Fossile Funde reichen bis 10.000 v. Chr. zurück und belegen, dass bereits zu dieser Zeit Guanako und Vikunja bejagt wurden, bevor dann um 5500 v. Chr. ihre Domestikation in der Pampasregion im zentralen Argentinien begann. Von dort verbreiteten sich Lamas in den folgenden Jahrhunderten in die Andentäler und waren bereits 1800 v. Chr. in Nordchile angesiedelt. Das Alpaka, dessen Domestikationsbeginn anhand des Auffindens des für ihn typischen Zahntyps auf 4000 v. Chr. datiert werden kann, folgte etwas später. Um 1000 n. Chr. waren die NWK dann bis an die Südküste Perus sowie in den Regenwäldern östlich der Zentralanden verbreitet. Um 500 n. Chr. begann sich die Nutzungsart zu ändern, und zur Fleischnutzung kam die Nutzung als Wolllieferanten hinzu. Besonders in der Tiahuanaco- und der Inka - Kultur war die Kamelidenhaltung sehr verbreitet, und neben der Nutzung als Fleisch- und Wolllieferanten sowie als Tragetiere spielten sie hier auch eine religiöse Rolle. Im Jahrhundert nach der Ankunft der spanischen Eroberer wurde der Bestand der domestizierten sowie der Wildformen durch eingeschleppte Krankheiten, Bejagung und Etablierung importierter Haustiere um 90 % dezimiert und in die unzugänglichen Gebiete der Hochanden verdrängt (HIENDLEDER und KESSLER 2002).

Bereits vor 1900 kamen die NWK auf die anderen Kontinente, wo sie zunächst vor allem in Zoos und Tierparks gehalten wurden (RAPPERSBERGER 2000).

In den letzten Jahrzehnten erfreut sich die private Zucht und Haltung von NWK auch in Australien, den USA und Mitteleuropa zunehmender Beliebtheit (GAULY et al. 1997). Die Zahl der in Deutschland lebenden NWK hat sich in den letzten 10 Jahren von 2000 Tieren (GAULY et al. 1997) auf zurzeit ca. 9000 Tiere (Dr. Thomas Wittek, Wien 2012, persönliche Mitteilung) erhöht; die Tendenz ist steigend.

NWK leben in freier Wildbahn in Familiengruppen aus 2 - 5 weiblichen Tieren, deren Nachkommen und einem männlichen Tier sowie Gruppen von 2 - 100 jungen männlichen Tieren. Aufgrund ihres weiten Verbreitungsgebietes von Bereichen auf Höhe des



## LITERATURÜBERSICHT

Meeresspiegels bis zu Höhen von 3000 m in den Anden sind sie klimatisch sehr anpassungsfähig und tolerieren Nässe und Trockenheit ebenso wie Kälte und Hitze (FOWLER und BRAVO 1998). Daher sind NWK auch an mitteleuropäische Bedingungen gut anpassungsfähig. Eine ganzjährige Weidehaltung in Gruppen ist möglich und ist die häufigste Haltungsform, wobei zumindest ein wetterfester Unterstand zur Verfügung stehen sollte (GAULY et al. 1997; GAULY 2004).

In Deutschland überwiegt die Haltung in kleinen Gruppen im Nebenerwerb, es gibt nur wenige Großbetriebe mit mehr als 100 Tieren. Neben der Haltung als Liebhaber- und Hobbytier liegt die wirtschaftliche Bedeutung vor allem im Im- und Export von Zuchttieren und in der Wollproduktion (Alpaka).

### 2.2 Weibliche Reproduktion

Da die reproduktive Anatomie und Physiologie bei allen NWK sehr ähnlich ist (FOWLER und BRAVO 1998), gelten die folgenden Ausführungen für alle Vertreter dieser Gattung.

NWK haben einen einzigartigen ovariellen Zyklus; sie gehören zu den induzierten Ovulatoren, unterscheiden sich aber von anderen, wie Katze oder Kaninchen, im Hormonverlauf (FOWLER und BRAVO 1998). Von spontanen Ovulationen wird in 5 % der Fälle berichtet (FERNANDEZ-BACA et al. 1970b). In Anatomie und Physiologie der Fortpflanzung ähneln NWK dem Pferd, so haben sie eine ähnlich lange Trächtigkeitsdauer von 335 - 350 Tagen, makroskopisch ebenfalls eine Semiplacenta diffusa und histologisch eine Placenta epitheliochorialis sowie einen nur sehr geringen Anteil an Zwillingsgeburten. Weiterhin sind sie schon kurze Zeit nach der Geburt wieder belegbar, ähnlich der Fohlenrosse beim Pferd (GAULY 2002).

Weibliche Tiere werden mit ca. 12 - 14 Monaten geschlechtsreif, wobei die Umweltbedingungen, besonders aber der Ernährungsstatus für den Zuchterfolg eine maßgebliche Rolle spielen. Tiere in Gefangenschaft, die keinen großen Schwankungen im Nahrungsangebot unterworfen sind, zeigen im Gegensatz zu wildlebenden Tieren keine Saisonalität, sondern sind ganzjährig sexuell aktiv. Dabei scheint der Zeitpunkt der Bedeckung keinen Einfluss auf Ovulationsrate, Fruchtbarkeit oder Embryonensterblichkeit zu haben (BROWN 2000). Neuweltkameliden zeigen kein Östrusverhalten, weshalb es für den Züchter schwierig ist den optimalen Deckzeitpunkt zu bestimmen, besonders wenn kein eigener Hengst zur Verfügung steht. Follikelwachstum, -reife und -regression dauern im Durchschnitt 10 - 14 Tage und finden in sich überlappenden Wellen statt, unabhängig von der sexuellen Aktivität. Follikeldurchmesser von 7 - 12 mm werden als reife Follikel bezeichnet, die nötig sind, damit eine Ovulation ausgelöst wird, größere werden als zystisch verändert angesehen (FOWLER und BRAVO

## LITERATURÜBERSICHT

1998). Hohe Östrogenwerte (Östradiol-17 $\beta$  und E1S) in Blut und Urin korrelieren mit dem Vorhandensein sprungreifer Follikel, während P4-Blutkonzentrationen bei unbedeckten Tieren normalerweise auf einem Basalniveau von < 1 ng/ml liegen (BRAVO 1994; ABA et al. 1995). Hohe Östradiolwerte führen beim unbedeckten Tier aber nicht zu einem präovulatorischen Anstieg der Gonadotropine (BRAVO et al. 1990). Die Deckbereitschaft der Stute ist unabhängig vom Vorhandensein sprungreifer Follikel. Taktile, audiovisuelle sowie olfaktorische Reize beim Deckakt führen reflektorisch zu einer Ausschüttung des Gonadotropin-Releasing-Hormone (GnRH) aus dem Hypothalamus, was wiederum die Freisetzung des Luteinisierenden Hormons (LH) aus dem Hypophysenvorderlappen initiiert. LH wirkt stimulierend auf reife Follikel und löst so deren Ovulation aus. Dies geschieht zwischen 24 - 48 Std. nach der Kopulation.

Fand keine Konzeption statt, erreicht der sich bildende Gelbkörper seine maximale Größe innerhalb von 7 - 10 Tagen und beginnt dann mit der Regression, ausgelöst durch Prostaglandin F $_{2\alpha}$  (PGF $_{2\alpha}$ ), was ca. ab Tag 9 post copulationem vom Endometrium gebildet wird, wenn embryonale Signale ausbleiben. Drei bis vier Tage nach der Gelbkörperregression erreichen die Follikel, deren Entwicklung während der Lutealphase durch das vom Gelbkörper gebildete P4 gehemmt wurde, wieder ihre normale Größe, und die Stute ist erneut aufnahmefähig (FOWLER und BRAVO 1998).

Es besteht bei NWK ein Unterschied in der luteolytischen Aktivität zwischen beiden Uterushörnern, was vermutlich u. a. auf eine unterschiedliche Gefäßanatomie zurückzuführen ist. Während die luteolytische Aktivität im rechten Uterushorn nur lokal auf Gelbkörper des rechten Ovars wirkt, besitzt das linke Uterushorn neben der Wirkung auf Gelbkörper des linken auch eine luteolytische Wirkung auf Gelbkörper des rechten Ovars, vermutlich durch eine lokale arteriovenöse Verbindung. In diesem Effekt wird eine mögliche Erklärung dafür vermutet, dass sich 98 % der Trächtigkeiten im linken Uterushorn manifestieren, obwohl beide Ovarien gleichmäßig aktiv sind; Embryos wandern vom rechten ins linke Uterushorn, um dem doppelten luteolytischen Effekt auf der rechten Seite zu entgehen. Welche Signale der Embryo wann genau ausschüttet, um die Luteolyse zu verhindern ist noch nicht ausreichend untersucht. Um dem Effekt von PGF $_{2\alpha}$  entgegenwirken zu können, muss es aber vor Zyklustag 10 geschehen (VAUGHAN und TIBARY 2006).

### 2.3 Endokrinologie der Trächtigkeit

Der sich im Anschluss an die Ovulation bildende Gelbkörper produziert während der gesamten Trächtigkeit P4, was essentiell für dessen Aufrechterhaltung ist. Ab dem 2. - 3. Tag post ovulationem sind, je nach Literaturangabe, Werte von > 1 ng P4/ml (BRAVO 1994; FOWLER und BRAVO 1998) bis > 2 ng P4/ml (BRAVO et al. 1996) im

## LITERATURÜBERSICHT

Blut nachweisbar. Dem P4 - Verlauf im Blut entsprechend ist der Verlauf von PdG, dem Hauptmetaboliten von P4, im Urin. Werte steigen von Basalwerten von 0,6 ng PdG/mg Kreatinin (Krea) innerhalb von 2 - 3 Tagen nach der Bedeckung auf > 100 ng PdG/mg Krea an und sinken, wie P4 im Blut, erst kurz vor der Geburt wieder ab. Erhöhte P4- und PdG - Konzentrationen reflektieren somit direkt das Vorhandensein von aktivem Lutealgewebe (BRAVO et al. 1991a; BRAVO et al. 1991b).

Hormone, wie z. B. RLN und E1S, die von der fetoplazentaren Einheit produziert werden, sind direkte Indikatoren für eine intakte Trächtigkeit (BRAVO et al. 1996). So steigen die Blutkonzentrationen von RLN ca. ab dem 3. Trächtigkeitsmonat von basal 2,4 ng RLN/ml auf > 25 ng RLN/ml an, sinken dann im 5. - 7. Monat auf Werte um 5 ng RLN/ml ab und steigen schließlich ab dem 8. Monat wieder auf bis zu 25 ng/ml an (BRAVO et al. 1996).

Ein früher Anstieg der Serum- und Urinkonzentration von E1S kann zwischen Tag 21 und 27 der Trächtigkeit beobachtet werden, wobei dreifach höhere Werte (Anstieg im Serum von 1,15 ng E1S/ml auf 42 ng E1S/ml, im Urin von 8 ng E1S/mg Krea auf 76 ng E1S/mg Krea) erreicht werden, als sie nicht tragende Tiere während normaler Follikelwellen zeigen. Obwohl die Quelle dieses Anstiegs derzeit noch nicht bekannt ist, wird vermutet, dass es entweder durch den Konzeptus selbst oder durch den Trophoblasten produziert wird und somit ein frühes Anzeichen für eine Mutter-Embryo-Interaktion darstellt. Ein zweiter Anstieg der E1S-Konzentration (im Serum auf 42 ng E1S/ml, im Urin bis auf 900 ng E1S/mg Krea) findet im letzten Trächtigkeitsmonat statt und ist höchstwahrscheinlich von der fetoplazentären Einheit produziert und somit ein möglicher Indikator für die Fetusviabilität (BRAVO et al. 1996).

### 2.4 Trächtigkeitsdiagnostik

Es werden zurzeit verschiedene Verfahren zur Trächtigkeitsdiagnostik bei NWK angewendet, die jeweils ihre Vor- und Nachteile aufweisen.

Eine einfache, jedoch nicht zuverlässige Methode ist das Abprobieren mit einem Hengst, da tragende Stuten sich in der Regel nicht bedecken lassen. Hierbei gibt es jedoch sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse, da erfahrene Stuten sich nicht von jedem Hengst decken lassen bzw. sehr virile Hengste auch nicht rezeptive, tragende Stuten decken. Außerdem besitzt nicht jeder Züchter einen eigenen Hengst, um diese Methode durchzuführen.

Eine manuelle rektale Untersuchung ist nur bei den größeren Lamastuten ab dem 30. - 35. Tag möglich, wobei die Handschuhgröße maximal 7,0 betragen sollte, da es sonst zu Verletzungen der Darmschleimhaut kommen kann, abgesehen von den Schmerzen, die den Tieren dabei zugefügt werden können (GAULY und BOURKE 1997).

## LITERATURÜBERSICHT

Die Bestimmung von P4 im Blut gehört momentan in Verbindung mit dem Abprobieren und der Ultraschalluntersuchung zu den am häufigsten angewendeten Methoden. Konzentrationen von  $> 1$  ng P4/ml (BRAVO 1994; FOWLER und BRAVO 1998) bis  $> 2$  ng P4/ml (BRAVO et al. 1996) ab Tag 14 - 21 deuten auf eine Trächtigkeit hin. Eine zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführte P4-Bestimmung gibt nur einen Hinweis auf eine erfolgte Ovulation, da auch bei Stuten, die nicht konzipiert haben, eine Lutealphase und somit eine P4-Produktion stattfindet. Diese ist ca. am 12. Tag abgeschlossen, und die P4-Werte fallen wieder auf das Basalniveau (FERNANDEZ-BACA et al. 1970a). Alternativ zu P4 im Blut kann PdG im Urin der Stuten bestimmt werden. Konzentrationen von  $> 100$  ng PdG/mg Krea deuten auf eine Trächtigkeit hin. Da hohe P4- bzw. PdG-Konzentrationen aber nur ein Anzeichen für das Vorhandensein aktiven Lutealgewebes sind und somit auch bei nicht tragenden Tieren von einem persistierenden Gelbkörper produziert werden können, ist die Anwendung einer zweiten Methode zur Bestätigung der Diagnose angeraten (BRAVO et al. 1991a; BRAVO et al. 1991b). Weiterhin sollte bei NWK aufgrund der physiologisch sehr hohen Rate an embryonalem Fruchttod, die bis zu 50 % noch im ersten Monat betragen kann, eine erneute Untersuchung im zweiten Trimester der Trächtigkeit erfolgen (BROWN 2000).

Einen verlässlicheren Hinweis auf das Vorliegen einer intakten Trächtigkeit bietet der Nachweis der von der fetoplazentaren Einheit produzierten Hormone RLN und E1S. Nachteil dieser Methoden ist jedoch zum einen, dass der Anstieg der RLN-Konzentration relativ spät, nämlich erst im 3. Trächtigkeitsmonat erfolgt (von basal 2,4 ng/ml auf  $> 25$  ng/ml) und somit nicht für die Frühdiagnostik geeignet ist. Zum anderen beschränkt sich der E1S-Konzentrationsanstieg in der Frühträchtigkeit auf eine sehr kurze Zeitspanne zwischen dem 21. - 27. Tag (von basal 1,15 ng/ml auf 42 ng/ml im Blut bzw. von 8 ng/mg Krea auf 75 ng/mg Krea in Urin), was die Probengewinnung und Nutzbarkeit dieses Tests erschwert und einschränkt (BRAVO et al. 1996).

Die sicherste Diagnosemöglichkeit einer Trächtigkeit ist die Ultraschalluntersuchung. Transrektal ist diese ca. ab dem 19. Trächtigkeitstag möglich, bedeutet aber einen hohen apparativen Aufwand sowie eine hohe Stressbelastung für die Stute. Außerdem besteht die Gefahr einer Rektumverletzung oder gar -perforation. Eine transabdominale Ultraschalluntersuchung ist dagegen erst ab dem 40.-50. Tag sicher aussagekräftig (KNAUF et al. 2008).

Im Gegensatz zu anderen Tierarten, wo die Hormonbestimmung in Milch und Speichel zur Trächtigkeitsdiagnostik herangezogen wird, liegen in der zugänglichen Literatur bislang keine derartigen Studien bei NWK vor. So ist der Nachweis von P4 in Milch und Speichel von Kühen (GAO et al. 1988; KARG 1994) bzw. in Milch von Altweltkamelen (RAHIM 1989; RAHIM und EL-NAZIER 1987) ebenso beschrieben wie der Nachweis

## LITERATURÜBERSICHT

von E1S in der Milch von Kühen (HENDERSON et al. 1994; ZDUNCZYK et al. 2002) bzw. im Speichel von Schweinen (OHTAKI et al. 1997) und Seehunden (PIETRASZEK und ATKINSON 1994).

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die trächtigkeitsassoziierten Hormone P4, PdG, E1S und RLN in Speichel, Milch und Urin von tragenden und nicht tragenden Alpakas im Vergleich zur jeweiligen Blutkonzentration bestimmt, um ihre Eignung zur nicht invasiven Trächtigkeitsdiagnostik zu untersuchen.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Publikation 1: „Trächtigkeitsdiagnostik beim Alpaka mittels Bestimmung von Progesteron und Pregnanediol-Glucuronid in Speichel, Milch und Urin.“**

Janine Volkery, Thomas Wittek, Axel Sobiraj, Jutta Gottschalk, Almuth Einspanier

Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift 123, 500-505 (2010) DOI  
10.2376/0005-9366-123-500

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 123,  
500–505 (2010)  
DOI 10.2376/0005-9366-123-500

© 2010 Schlütersche  
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG  
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:  
jvolkery@googlemail.com

Eingegangen: 02.12.2009  
Angenommen: 05.05.2010

#### Zusammenfassung

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Leipzig<sup>1</sup>  
Scottish Centre for Production Animal Health & Food Safety, Faculty of Veterinary  
Medicine, University of Glasgow, Großbritannien<sup>2</sup>  
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik, Universität Leipzig<sup>3</sup>

### Trächtigkeitsdiagnostik beim Alpaka mittels Bestimmung von Progesteron und Pregnanediol-Glucuronid in Speichel, Milch und Urin

*Progesterone and pregnanediol-glucuronid concentrations in  
saliva, milk and urine of female alpacas and their application  
in pregnancy diagnosis*

Janine Volkery<sup>1</sup>, Thomas Wittek<sup>2</sup>, Axel Sobiraj<sup>3</sup>, Jutta Gottschalk<sup>1</sup>, Almuth Einspanier<sup>1</sup>

Gegenstand dieser Studie war die Bestimmung der trächtigkeitsassoziierten Hormone Progesteron (P4) und Pregnanediol-Glucuronid (PdG) in Speichel, Milch und Urin von Alpakas, mit dem Ziel deren Eignung in der nicht invasiven Trächtigkeitsdiagnostik zu untersuchen. Es wurden von 36 Alpakastuten jeweils vor der Bedeckung und in ca. zweimonatlichem Rhythmus während der gesamten Trächtigkeit Blut-, Speichel-, Milch- und Urinproben gesammelt und die Hormonkonzentrationen von P4 und PdG mittels Enzymimmunoassay (EIA) bestimmt. Zu jeder Probenentnahme wurde der Trächtigkeitsstatus durch eine Ultraschalluntersuchung verifiziert. Weiterhin wurden die Milchproben in einem semiquantitativen Progesteron-Schnelltest für Rinder eingesetzt. Die im EIA gemessenen Konzentrationen von P4 in Blut, Milch und Urin sowie von PdG im Urin tragender Tiere sind signifikant höher als bei nicht tragenden Tieren. Im Speichel konnten keine signifikanten Unterschiede in den P4- oder PdG-Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Der Progesteron-Schnelltest in der Milch erkannte 90 % der tragenden Stuten als tragend und 69 % der nicht tragenden Tiere als nicht tragend, wobei von den falsch positiven Milchproben jedoch 70 % auch mit dem laborgebundenen EIA falsch positive Ergebnisse lieferten. Die gemessenen Konzentrationen von P4 im Blut bzw. PdG im Urin stimmen mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein und können somit als indirekter Trächtigkeitsmarker bestätigt werden. Milch stellt ein geeignetes Medium dar, während Speichel für eine Trächtigkeitsdiagnostik beim Alpaka ungeeignet ist. Die Nutzung von Milch und Urin zur Trächtigkeitsdiagnose würde insofern eine Vereinfachung der derzeit gängigen Methoden (u. a. Blutprogesteron) darstellen, als dass der Besitzer die Proben selbst gewinnen kann und dies mit erheblich weniger Stress für die Tiere verbunden wäre. Die Bestimmung von P4 in Milch und PdG in Urin stellen somit geeignete Alternativen zur Frühdiagnostik im ersten Trächtigkeitsmonat dar, da zu diesem Zeitpunkt eine transabdominale Ultraschalluntersuchung noch nicht möglich ist. Da hohe P4- bzw. PdG-Werte nur aktives Lutealgewebe reflektieren und somit nur von einer Verdachtsdiagnose gesprochen werden kann, sollte die Diagnose durch eine transabdominale Ultraschalluntersuchung zu einem späteren Zeitpunkt der Trächtigkeit abgesichert werden.

**Schlüsselwörter:** Neuweltkameliden, Trächtigkeitsdiagnose, Progesteron, Pregnanediol, Progesteron-Bestimmung

#### Summary

U.S. Copyright Clearance Center  
Code Statement:  
0005-9366/2010/12311-500 \$ 15.00/0

The objective of the present study was the measurement of the pregnancy associated hormones progesterone (P4) and pregnanediol-glucuronide (PdG) in saliva, milk and urine of alpacas and their potential use in pregnancy diagnosis. Samples of blood, saliva, milk and urine were obtained from 36 female alpacas before mating and throughout the pregnancy. Concentrations of P4 and PdG were determined using an enzyme immunoassay (EIA). Pregnancy was checked

by ultrasonography at any sampling time. The milk samples were also tested using a commercial on-farm progesterone kit which was designed for dairy cattle. EIA-Concentrations of P4 in blood, milk and urine and urine PdG concentrations were significantly higher in pregnant than in not pregnant alpacas. There was no difference in concentrations of P4 or PdG in saliva. The accuracy of the progesterone kit was 90% for diagnosis of pregnancy and 69% for non-pregnancy. However, 70% of the false positive results also showed relatively high P4 milk concentrations in the EIA. Values of P4 in blood and PdG in urine are comparable to previous reports in alpacas and therefore can be confirmed as an indicator for pregnancy. Saliva seems unsuitable in pregnancy diagnosis in alpacas, whereas milk seems to be an adequate alternative. The use of milk and urine would simplify the pregnancy diagnosis in alpacas since in contrast to the current methods (e. g. blood progesterone) the owners can take the samples. The avoidance of blood sampling results in a considerable stress reduction for the animals. P4 measurement in milk and PdG measurement in urine are good alternatives in pregnancy diagnosis during the first month of pregnancy, when a trans-abdominal ultrasonographic examination is not yet reliable. However, since high values of P4 and PdG only show the presence of active luteal tissue and therefore are indirect markers of pregnancy the diagnosis should be confirmed using ultrasound later in pregnancy.

**Keywords:** new world camelids, pregnancy diagnosis, progesterone, pregnanediol, progesterone testing

## Einleitung

Die Haltung und Zucht von Neuweltkameliden (NWK), besonders von Alpakas, erfreuen sich in Deutschland wachsender Beliebtheit. Zurzeit überwiegt die Haltung in kleinen Gruppen als Liebhaber- oder Hobbytiere; die professionelle Haltung im Haupt- oder Nebenerwerb nimmt jedoch zu. Die wirtschaftliche Bedeutung liegt v. a. im Im- und Export von Zuchttieren sowie in der Wollproduktion (Alpaka). Bei der Zucht sind reproduktionsphysiologische Besonderheiten zu bedenken, so zeigen die Tiere kein Östrusverhalten: Der Eisprung erfolgt als provozierte Ovulation durch den Deckakt (Fowler und Bravo, 1998). Weiterhin haben Alpakas mit etwa 350 Tagen eine lange Trächtigkeitsdauer mit einer überdurchschnittlich hohen Rate an embryonalem Fruchttod (30–50 %) im ersten Trächtigkeitsmonat (Brown, 2000).

Der sich im Anschluss an die Ovulation bildende Gelbkörper produziert während der gesamten Trächtigkeit Progesteron (P4), was essenziell für deren Aufrechterhaltung ist. Ab dem 2.–3. Tag post ovulationem sind, je nach Literaturangabe, Werte von > 1 ng/ml (Bravo, 1994; Fowler und Bravo, 1998) bis > 2 ng/ml P4 (Bravo et al., 1996) im Blut nachweisbar, was ab 14–21 Tage nach der Bedeckung zur indirekten Trächtigkeitsdiagnose herangezogen werden kann. Eine zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführte P4-Bestimmung gibt nur einen Hinweis auf eine erfolgte Ovulation, da auch bei Stuten, die nicht aufnehmen, eine Lutealphase und somit eine Progesteronproduktion stattfindet. Diese ist ca. am 12. Tag abgeschlossen und die P4-Werte liegen wieder auf Basalniveau (Fernandez-Baca et al., 1970). Der Verlauf von Pregnanediol-Glucuronid (PdG), dem Hauptmetaboliten von Progesteron, korreliert in Urin mit dem von P4 in Blut. Die PdG-Werte steigen von basal 36,0 ng PdG/mg Kreatinin (Krea) innerhalb von 2–3 Tagen nach der Bedeckung auf > 100 ng PdG/mg Krea an und sinken, wie Progesteron im Blut, erst kurz vor der Geburt wieder ab. Erhöhte P4- und PdG-Konzentrationen reflektieren somit direkt das Vorhandensein von aktivem Lutealge-

webe (Bravo et al., 1991a, 1991b). Alternativ besteht die Möglichkeit Hormone, wie z. B. Estronsulfat und Relaxin zu bestimmen, die von der fetoplazentaren Einheit produziert werden und somit direkte Trächtigkeitsmarker darstellen (Bravo et al., 1996).

Während der Nachweis von P4 in Milch und Speichel bei Kühen (Gao et al., 1988; Karg, 1994) bzw. in Milch von Altweltkamelen (Rahim und El-Nazier, 1987) bereits beschrieben worden ist und in der indirekten Trächtigkeitsdiagnostik angewandt wird, liegen offensichtlich keine Studien zur Bestimmung von P4 bzw. PdG in Speichel und Milch von Neuweltkameliden vor. Die Nutzbarkeit der Medien Milch, Speichel und Urin zur Trächtigkeitsdiagnostik würde eine Vereinfachung der derzeitigen Methoden (u. a. P4-Bestimmung im Blut und Ultraschalluntersuchung) darstellen, da diese Proben vom Besitzer selbst entnommen werden können und so zusätzlicher Stress für die Tiere durch die invasive Blutentnahme vermieden werden könnte. Besonders zur Frühdiagnostik im ersten Trächtigkeitsmonat wären diese Proben eine gute Alternative, da eine transabdominale Ultraschalluntersuchung erst ab dem 40.–50. Tag aussagekräftig ist. Eine transrektale Ultraschalluntersuchung, die ab dem 19. Tag der Trächtigkeit möglich ist, bedeutet einen hohen apparativen Aufwand sowie eine relativ hohe Stressbelastung für die Stute (Knauf et al., 2008). Daher sollten in der vorliegenden Untersuchung die Hormongehalte der verschiedenen Probenmaterialien im Vergleich zum Blutprogesteron bei tragenden und nicht tragenden Tieren bestimmt und ihre Eignung zur nicht invasiven Trächtigkeitsdiagnose untersucht werden.

## Tiere, Material und Methoden

### Tiere und Probensammlung

Die Untersuchung wurde über einen Zeitraum von zwei Jahren an 36 Alpakastuten im Alter von 3–15 Jahren (im Durchschnitt 7,2 Jahre) in Sachsen durchgeführt. Nach



**TABELLE 1:** Konzentrationen von P4 und PdG in verschiedenen Medien bei sonografisch für nicht tragend bzw. für tragend befundenen Alpakas. MW  $\pm$  SEM in ng/ml (Serum, Speichel, Milch) bzw. ng/mg Krea (Urin). n = Probenanzahl; \*p < 0,01; \*\*p < 0,05

	P4		PdG	
	nicht tragend	tragend	nicht tragend	tragend
Serum	0,26 $\pm$ 0,03 (n = 49)	2,87 $\pm$ 0,10* (n = 117)	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Speichel	2,38 $\pm$ 0,34 (n = 13)	3,01 $\pm$ 0,32 (n = 26)	4,48 $\pm$ 0,99 (n = 5)	5,42 $\pm$ 0,92 (n = 6)
Milch	0,83 $\pm$ 0,06 (n = 35)	4,09 $\pm$ 0,38* (n = 41)	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Urin	0,29 $\pm$ 0,04 (n = 8)	0,60 $\pm$ 0,06** (n = 17)	26,70 $\pm$ 2,80 (n = 13)	152,73 $\pm$ 17,37* (n = 25)

Gewinnung einer Nullprobe wurden die Tiere gedeckt und im Laufe der gesamten Trächtigkeit durchschnittlich fünf Proben pro Tier gesammelt. Die erste Probe nach der Bedeckung wurde frühestens am 11. Tag, im Durchschnitt erst zwischen Tag 30–40 (37,1  $\pm$  1,6) der Trächtigkeit gewonnen, die weitere Probenentnahme erfolgte im ca. zweimonatlichen Rhythmus. Es wurden nur physiologisch verlaufende Trächtigkeiten in der Auswertung berücksichtigt. Kam es zum embryonalen Fruchttod (35 % der Fälle), wurde eine erneute Nullprobe gewonnen, die Stute kurz später gedeckt und in der folgenden Trächtigkeit wieder in die Auswertung aufgenommen. Zum Zeitpunkt jeder Probenentnahme wurden Blut-, Speichel-, bei laktierenden Tieren Milchproben und, wenn möglich, Urinproben gewonnen und der Trächtigkeitsstatus durch eine transabdominale Ultraschalluntersuchung mittels eines 5 MHz Linear-schallkopfs (US-Gerät: LOGIQ 100 Pro Vet, Fa. GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) ermittelt. Die Blutentnahme erfolgte nach Fixation des Tieres durch Punktion der Vena jugularis externa in handelsübliche Serum-Blutentnahmeröhrchen. Nach Zentrifugation mit 4000 g bei 4 °C für 10 min. (Labofuge 400R, Fa. Heraeus

Instruments) wurde das Serum abpipetiert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

Die Speichelproben wurden mittels speziellen Speichelentnahmesets (Salivette®, Fa. Sarstedt, D) aus der Maulhöhle der Tiere gesammelt, ebenfalls bei 4000 g bei 4 °C für 10 min. abzentrifugiert, aliquotiert und bei –20 °C tiefgekühlt.

Die Milchproben wurden bei laktierenden Stuten per Hand in handelsübliche Milchröhrchen ohne Zusätze gemolken. Es konnten nicht immer von allen Tieren ausreichende Mengen Milch gewonnen werden, da sich die Tiere z. T. unkooperativ zeigten oder

das Fohlen kurz zuvor getrunken hatte.

Der Spontanurin wurde von den Besitzern maximal 24 Stunden vor der Blutentnahme in Röhrchen ohne Zusätze gesammelt. Allerdings war es nicht allen Besitzern aufgrund unkooperativer Tiere möglich Urin zu sammeln. Alle Proben wurden bis zu ihrer Verwendung tiefgekühlt bei –20 °C gelagert.

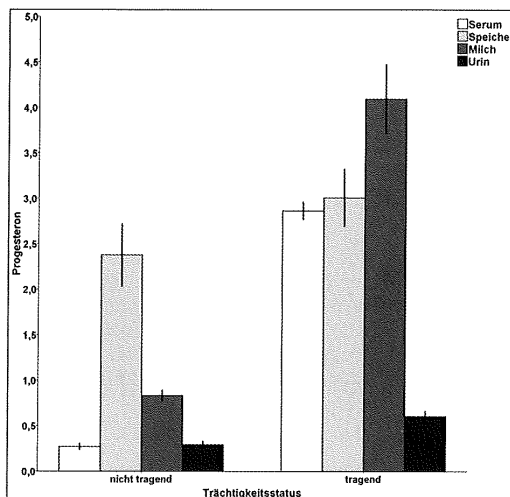
#### Hormonassays

Die P4-Bestimmung erfolgte mittels eines modifizierten Doppelantikörper-Enzymimmunoassays (EIA) nach Einspanier und Hodges (Einspanier und Hodges, 1994). Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,05 ng/ml, der Intra-assaykoeffizient lag bei 10,4 %, der Interassaykoeffizient bei 10,3 %. Serum und Urin wurde vor Einsatz im Assay mittels Petrolether im Verhältnis 1 : 1, Milch mittels absolutem Ethanol im Verhältnis 1 : 5, extrahiert; Speichel wurde im Original eingesetzt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Verdünnungsreihen von Proben mit und ohne Zusatz definierter Mengen P4 lagen parallel zur Standardkurve. Die Wiederfindungsraten lagen bei 94 % (Serum), 93 % (Speichel), 99 % (Milch) und 96 % (Urin).

Die PdG-Bestimmung erfolgte nach demselben Prinzip wie der P4-EIA, jedoch unter Verwendung des entsprechenden PdG-Standards (P3635, Fa. Sigma, Steinheim), eines PdG-spezifischen Antikörpers (R13904, Clinical Endocrinology Laboratory, UC Davis, CA, USA) und des entsprechenden Enzyms (PdG:HRP, lot 12-11-2008, Clinical Endocrinology Laboratory, UC Davis, CA, USA). Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,05 ng/ml, der Intraassaykoeffizient bei 8,4 %, der Interassaykoeffizient bei 14,2 %. Die Verdünnungsreihen von Urin und Speichel mit und ohne Zusatz definierter Mengen PdG lagen parallel zur Standardkurve und die Wiederfindungsrate lag bei 95,5 % (Urin), bzw. 117 % (Speichel), sodass Urin- und Speichelproben im Original eingesetzt werden konnten.

#### Kreatinin-Bestimmung

Die Kreatininkonzentration der Urinproben wurde im Labor der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig mit dem Hitachi 912 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bestimmt und der jeweilige Hormongehalt auf die Kreatininkonzentration bezogen. Da die Kreatininausscheidung in 24 Stunden relativ konstant und unabhängig von der Urinkonzentrierung ist, konnte so eine eventuelle Beeinflussung der Ergebnisse durch Unterschiede in Flüssigkeitsaufnahme und -ausscheidung zwischen den Tieren ausgeschlossen werden.



**ABBILDUNG 1:** Vergleich der P4-Konzentration in verschiedenen Medien bei sonografisch für nicht tragend bzw. für tragend befundenen Alpakastuten. MW  $\pm$  SEM in ng/ml (Serum, Speichel, Milch) bzw. in ng/mg Krea (Urin).

### Progesteron-Schnelltest

Milchproben, von denen genug Material vorhanden war (tragende Tiere:  $n = 31$ , nicht tragende Tiere:  $n = 32$ ), wurden zusätzlich zur P4-Bestimmung im EIA, in einem handelsüblichen Schnelltest für Rinder (Hormonost® Milchkuh, Firma Biolab, D) eingesetzt. Bei dem Test handelt es sich um einen semiquantitativen Test nach dem ELISA-Prinzip, bei dem anhand von Farbabstufungen von Blau zu Weiß im Vergleich zu mitgeführten Standards eine Unterscheidung verschiedener P4-Konzentrationen und somit in tragend zu nicht tragend erfolgt. Die untere Nachweisgrenze bei der eine Farbänderung sichtbar ist liegt laut Herstellerangaben bei 2 ng/ml.

### Statistische Auswertung

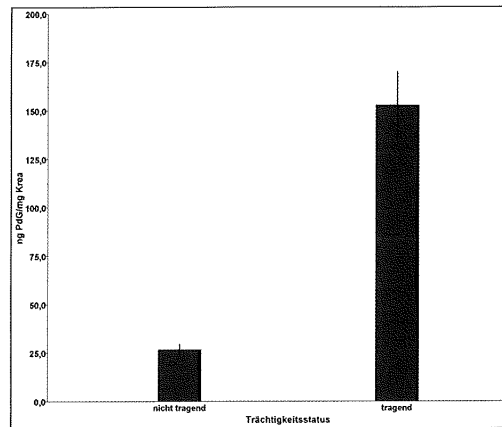
Alle Daten sind als arithmetisches Mittel ( $\bar{x}$ )  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurde auf Normalverteilung geprüft. Die Daten der graviden und ingraviden Tiere wurden mittels t-Test für unabhängige Stichproben bzw. Mann-Whitney-U-Test verglichen. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  galten als signifikant.

## Ergebnisse

Die Mittelwerte in den verschiedenen Probenmaterialien und der Vergleich der Hormonkonzentrationen zwischen graviden und ingraviden Tieren sind in Tabelle 1 und in Abbildung 1 dargestellt. Die P4-Konzentration in Serum, Milch und Urin ist bei tragenden Tieren signifikant höher als bei nicht tragenden Tieren (Serum, Milch:  $p < 0,01$ , Urin:  $p < 0,05$ ). Im Speichel ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar (Tab. 1, Abb. 1). Der Gehalt an PdG im Urin ist bei graviden Tieren signifikant höher ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu ingraviden Tieren (Tab. 1, Abb. 2) und der Verlauf ähnelt dem von P4 im Serum (Abb. 3). Im Speichel ist kein signifikanter Unterschied in der PdG-Konzentration feststellbar (Tab. 1). Der Hormonost® Schnelltest erkannte 28 von 31 Milchproben tragender Tiere richtig als tragend, was einem Prozentsatz von 90 % entspricht. Die drei falsch negativen Proben zeigten im EIA P4-Werte zwischen 1–2 ng/ml. Dagegen wurden 22 von 32 Proben nicht tragender Tiere als nicht tragend identifiziert (69 %). Von den 10 falsch positiven Proben zeigten 7 Proben im EIA einen Progesteronwert von  $> 1$  ng/ml, die entsprechenden P4-Konzentrationen im Blut lagen dagegen  $< 1$  ng/ml.

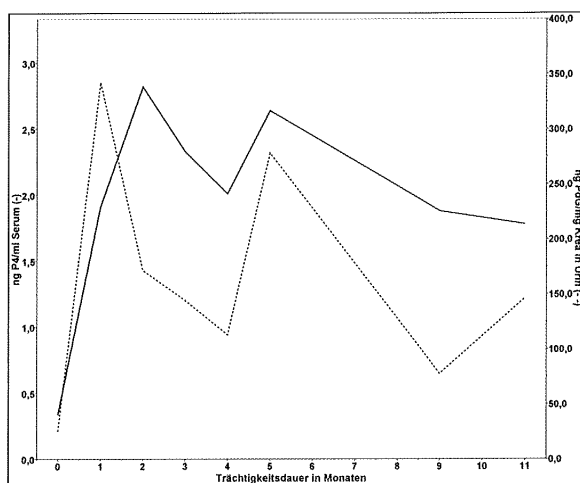
## Diskussion

In der vorliegenden Studie sollten die Hormonwerte von P4 bzw. PdG in Speichel, Milch und Urin von Alpakas im Vergleich zum Blutprogesteron bestimmt werden, mit dem Ziel ihre Eignung zur nicht invasiven Trächtigkeitsdiagnostik zu untersuchen. Die gemessenen Blutkonzentrationen von Progesteron stimmen mit früheren Untersuchungsergebnissen an NWK überein (Bravo, 1994; Bravo et al., 1996; Fowler und Bravo, 1998). P4 im Blut kann somit als Trächtigkeitsmarker beim Alpaka bestätigt werden: Niedrige P4-Werte schließen eine Trächtigkeit mit an Sicher-



**ABBILDUNG 2:** Vergleich der PdG-Konzentration in Urin bei sonografisch für nicht tragend bzw. für tragend befundenen Alpakastuten. MW  $\pm$  SEM in ng PdG/mg Krea.

heit grenzender Wahrscheinlichkeit aus, während hohe Werte einen aktiven Gelbkörper anzeigen und somit eine Verdachtsdiagnose „tragend“ zulassen. Anders sieht die Situation mit Speichel aus: Dort zeigen gravide und ingravide Tiere nahezu identische P4-Werte. Auch ein Extraktionsversuch mittels Petrolether, einem in unserem Labor für die P4-Extraktion aus verschiedenen Probenmaterialien getesteten und bewährten Mittel, brachte keinen Unterschied. Im Gegensatz zu Kühen, wo die Speichelkonzentration von Progesteron mit der Plasmakonzentration korreliert (Gao et al., 1988), scheint im Alpaka-Speichel eine Komponente, eventuell aus dem Futter oder dem Vormagen, enthalten zu sein, die im EIA zu falsch positiven P4-Ergebnissen führt. Auch gab es keine signifikanten Unterschiede im PdG-Gehalt zwischen graviden und ingraviden Tieren, sodass Speichel als Medium zur Trächtigkeitsdiagnostik über die Bestimmung von P4 bzw. dessen Metaboliten



**ABBILDUNG 3:** Verlauf von P4 im Serum (ng/ml; MW) und PdG im Urin (ng/mg Krea; MW) tragender Alpakas.

Pregnanediol-Glucuronid beim Alpaka nicht geeignet scheint. Nachdem erste Auswertungen diesen Schluss nahelegten, wurde aus Zeit- und Kostengründen auf die Untersuchung der restlichen Proben verzichtet.

Der P4-Gehalt ist im Urin tragender Tiere im Vergleich zu nicht tragenden Tieren signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Die Absolutwerte sind jedoch sehr niedrig und liegen derart nahe beieinander, dass selbst im eingesetzten Assay, der mit einer Nachweisgrenze von 0,05 ng/ml als sehr empfindlich bezeichnet werden kann, eine sichere Unterscheidung tragend zu nicht tragend nicht zu gewährleisten ist. Daher ist die P4-Bestimmung im Urin für die Praxis nicht geeignet. Die niedrigen P4-Werte im Urin sind wahrscheinlich darin begründet, dass das Progesteron in der Leber bereits metabolisiert worden ist und die Ausscheidung im Urin hauptsächlich als Metabolit Pregnanediol-Glucuronid erfolgt.

Dafür sprechen die in dieser Studie gemessenen Urinwerte von PdG: sie sind signifikant höher bei tragenden als bei nicht tragenden Tieren ( $p < 0,01$ ). Unsere Werte beim Alpaka stimmen teilweise mit früheren Untersuchungen von Bravo et al. (1991a), die an fünf Lamas erhoben wurden, überein, wo 5 Tage post partum Basalwerte von  $36,0 \pm 5,2$  ng PdG/mg Krea und in der frühen Trächtigkeit Werte von  $132,5 \pm 16,1$  ng PdG/mg Krea gemessen wurden. In den letzten 20 Tagen der Trächtigkeit erfolgte dort aber ein Anstieg der Hormonkonzentration auf  $209,5 \pm 26,6$  ng PdG/mg Krea, was in unserer Studie nicht festgestellt werden konnte. Dies kann in einem tierartspezifischen Unterschied zwischen Lamas und Alpakas oder aber in der niedrigen Tierzahl von 5 Stuten begründet liegen. Die in einer anderen Studie von Bravo et al. (1991b) an Lamas und Alpakas gemessenen sehr niedrigen Basalwerte von 0,6 ng PdG/mg Krea konnten wir zu keinem Zeitpunkt nachweisen. Die Gewinnung der Urinproben stellte sich bei vielen Tieren schwierig dar, da eine Provokation des Harnabsatzes nicht möglich war und das Auffangen von Spontanharn aufgrund unkooperativer Tiere oft sehr zeitaufwendig oder gar nicht möglich war. Möglicherweise lässt sich dies durch Training und Gewöhnung der Tiere verbessern.

Die P4-Konzentration in Milch ist signifikant höher bei tragenden als bei nicht tragenden Tieren ( $p < 0,01$ ), sodass die P4-Bestimmung in Milch zur Trächtigkeitsdiagnose beim Alpaka herangezogen werden kann. Dies stimmt mit Untersuchungen bei anderen Tierarten überein, nach denen die P4-Messung in Milch von Kühen und kleinen Wiederkäuern (Dionysius, 1991; Gao et al., 1988), sowie von Altweltkamelen (Rahim, 1989; Rahim und El-Nazier, 1987) hilfreich zur Zyklus- und Trächtigkeitsdiagnostik genutzt wird. Die P4-Bestimmung im Medium Milch ist also prinzipiell möglich. Der in dieser Studie getestete P4-Schnelltest für Milchkühe zeigt mit einer Genauigkeit von 90 % tragende bzw. 69 % nicht tragende Tiere richtig an. Die im Schnelltest falsch negativ beurteilten Proben zeigten alle im EIA P4-Werte zwischen 1 und 2 ng/ml und lagen somit unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze von 2 ng/ml. Von den im Schnelltest falsch positiv beurteilten Milchproben zeigten 70 % im EIA P4-Werte von  $> 1$  ng/ml und wären somit ebenfalls falsch positiv oder zumindest als fraglich beurteilt worden. Die entsprechenden Blutproben wiesen im EIA jedoch Konzentrationen  $< 1$  ng/ml auf und wären somit richtigerweise als nicht tragend beurteilt worden. Möglicherweise wird die Genauig-

keit bei der P4-Bestimmung in Milch verbessert, wenn Einflüsse durch Transport und Einfrieren der Proben, welchen alle eingesetzten Proben unterworfen waren, wegfallen und gewonnene Milchproben zeitnah im Stall untersucht werden. Da der Schnelltest für die Anwendung in der Zyklusdiagnostik bei Milchkühen optimiert ist und die gewählte Nachweisgrenze für das Alpaka nicht optimal ist, kann er beim Alpaka keine hundertprozentige Genauigkeit liefern. Die Untersuchungen zeigen aber dass er v. a. in der Frühträchtigkeit für den Züchter geeignet ist um vor Ort eine erste Verdachtsdiagnose zu stellen.

### Fazit für die Praxis

Speichel ist als Medium zur indirekten Trächtigkeitsdiagnostik beim Alpaka offenbar ungeeignet. Die P4-Bestimmung in Milch sowie die PdG-Bestimmung im Urin stellen geeignete Alternativen zu invasiven Methoden der Trächtigkeitsdiagnostik, wie der Blutprobenentnahme beim Alpaka dar. Der Einsatz eines kommerziell erhältlichen P4-Schnelltests für Milchkühe ist ebenfalls eine geeignete Alternative für Alpakas. Um genaue Grenzwerte bzw. die besten Entnahmezeitpunkte festzulegen, müssen weitere Untersuchungen mit höheren Tierzahlen folgen. Da eine hohe P4-Konzentration letztendlich nur aktives Lutealgewebe reflektiert, sind falsch positive Ergebnisinterpretationen, z. B. beim Vorhandensein eines persistierenden Gelbkörpers, möglich. Daher sollte die Diagnose „sicher tragend“ bzw. „sicher nicht tragend“ zu einem späteren Zeitpunkt durch eine transabdominale Ultraschalluntersuchung verifiziert werden.

### Danksagung

Wir danken der Alpaka Association (AA e. V.), dem Verein der Züchter, Halter und Freunde von Neuweltkamelen (NWK e. V.) sowie dem Alpaka Zucht Verband Deutschland (AZVD) für die finanzielle Unterstützung. Weiterhin gilt unser Dank den beteiligten Alpakazüchtern für Ihre Kooperation.

Conflict of interest: Der Autor erklärt, dass keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder andere persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma vorliegen, welche die in diesem Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

### Literatur

- Bravo PW (1994):** Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 10: 265–279.
- Bravo PW, Stabenfeldt GH, Fowler ME, Lasley BL (1991a):** Urinary Steroids in the Periparturient and Postpartum Periods Through Early-Pregnancy in Llamas. *Theriogenol* 36: 267–278.
- Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley BL, Fowler ME (1991b):** The Effect of Ovarian Follicle Size on Pituitary and Ovarian Responses to Copulation in Domesticated South-American Camelids. *Biol Reprod* 45: 553–559.
- Bravo PW, Stewart DR, Lasley BL, Fowler ME (1996):** Hormonal indicators of pregnancy in llamas and alpacas. *J Am Vet Med Assoc* 208: 2027–2030.

- Brown BW (2000):** A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci* 58: 169–195.
- Dionysius DA (1991):** Pregnancy Diagnosis in Dairy Goats and Cows Using Progesterone Assay Kits. *Aust Vet J* 68: 14–16.
- Einspanier A, Hodges JK (1994):** Lh- and Chorionic Gonadotropin-Stimulated Progesterone Release In-Vitro by Intact Luteal Tissue of the Marmoset Monkey (*Callithrix jacchus*). *J Endocrinol* 141: 403–409.
- Fernandez-Baca S, Hansel W, Novoa C (1970):** Corpus luteum function in the alpaca. *Biol Reprod* 3: 252–261.
- Fowler ME, Bravo PW (1998):** Reproduction. In: Fowler ME (Hrsg.), *Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuna, Guanaco*. Iowa State University Press, 381–429.
- Gao Y, Short RV, Fletcher TP (1988):** Progesterone Concentrations in Plasma, Saliva and Milk of Cows in Different Reproductive States. *Br Vet J* 144: 262–268.
- Karg H (1994):** Hormonanalytische Kontrolle von Fortpflanzungsfunktionen. In: Döcke F (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag Jena, 3. Aufl., Stuttgart, 766–783.
- Knauf S, Schwalm A, Wehrend A (2008):** Physiology of reproduction in domesticated South American camelids. *Tierarztl Prax G* 36: 313–318.
- Rahim SEAA (1989):** The use of milk progesterone analysis to monitor reproductive activity in the camel (*Camelus dromedarius*). *Br Vet J* 145: 23–27.
- Rahim SEAA, El-Nazier AE (1987):** Estimation of progesterone level in camels' (*Camelus dromedarius*) milk and its application in pregnancy diagnosis. *Br Vet J* 143: 555–559.

**Korrespondenzadresse:**

Janine Volkery  
 Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut  
 Universität Leipzig  
 An den Tierkliniken 1  
 04103 Leipzig  
 jvolkery@googlemail.com

**3.2 Publikation 2: “Progesterone, pregnanediol-3-glucuronid, relaxin and oestrone sulphate concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas (*Vicugna pacos*) and their application in pregnancy diagnosis.”**

Janine Volkery, Thomas Wittek, Axel Sobiraj, Almuth Einspanier

Veterinary Record 2012, Aug 25;171(8):195. Epub 2012 Aug 2, DOI:10.1136/vr.100393

# Papers

## Progesterone, pregnanediol-3-glucuronide, relaxin and oestrone sulphate concentrations in saliva, milk and urine of female alpacas (*Vicugna pacos*) and their application in pregnancy diagnosis

J. Volkery, J. Gottschalk, A. Sobiraj, T. Wittek, A. Einspanier

The pregnancy-associated hormones, progesterone (P4), pregnanediol-3-glucuronide (PdG), relaxin (RLN) and oestrone sulphate (E1S) in plasma, saliva, milk and urine of alpacas were measured in order to assess their potential use for pregnancy diagnosis. Samples were obtained from 36 female alpacas before mating and at different stages throughout pregnancy (confirmed by ultrasonography). The hormone concentrations were determined using enzyme immunoassays. Milk samples were also tested using a commercial on-farm P4 kit, designed for dairy cattle. Although the concentration of P4 in plasma, milk and urine, and the concentration of PdG in urine were significantly higher in pregnant than in non-pregnant alpacas, there was no difference in the concentrations of P4 or PdG in saliva. The on-farm milk P4 kit showed a sensitivity of 90 per cent for diagnosis of pregnancy and a specificity of 69 per cent for non-pregnancy. The concentration of RLN in plasma increased significantly after the second month, and concentration of E1S in plasma and urine during the last month of pregnancy, whereas, there were no significant differences in RLN or E1S concentrations in saliva and milk between pregnant and non-pregnant alpacas. Values of P4, RLN and E1S in plasma, and PdG and E1S in urine are comparable with the previous reports in alpacas and, therefore, can be confirmed as an indicator for pregnancy. This is the first study to include determination of pregnancy-associated hormones in the saliva and milk of alpacas. However, saliva seems to be unsuitable for pregnancy diagnosis in alpacas, whereas, P4 in milk, as well as PdG and E1S in urine, seem to be adequate tools for diagnosis.

### Introduction

In recent years, the population of domesticated South American camelids (SACs), especially of the alpaca (*Vicugna pacos*), has increased rapidly in Europe. These animals are reared for breeding, fibre production, animal-assisted therapy in human medicine or as companion animals. SACs show some unique reproductive characteristics: ovulation can be induced in them with no signs of oestrous behaviour in the absence of a male (Fowler and Bravo 1998). Furthermore, the gestation period is relatively long (mean gestation

length of 345 days), and embryonic losses during the first month of pregnancy occur in a high percentage of pregnancies (30–50 per cent) (Fernandez-Baca and others 1970b, Brown 2000).

The corpus luteum (CL) is formed after ovulation and produces progesterone (P4) throughout the gestation period, which is necessary for the maintenance of pregnancy. Increased P4 plasma concentrations (>1 ng/ml (Bravo 1994, Fowler and Bravo 1998), >2 ng/ml (Bravo and others 1996)) can be detected from day 2 after ovulation and can be used as an indirect marker for pregnancy from day 14 to day 21 after mating. Increased P4 values within two weeks post-mating indicate ovulation and CL formation. In unsuccessful matings, luteolysis occurs at around day 12 after ovulation, and P4 concentrations immediately return to basal values (Fernandez-Baca and others 1970a). The concentration of pregnanediol-glucuronid (PdG), a metabolite of P4 excreted in urine, correlates with plasma P4 concentration. Concentrations of PdG increase from 36.0 ng PdG/mg creatinine (Cr) to >100 ng PdG/mg Cr 2–3 days after mating and decrease in P4 in plasma immediately before parturition. Similar to P4, increased PdG concentrations reflect the presence of active luteal tissue, but not necessarily an intact pregnancy (Bravo and others 1991a, b).

Direct hormonal markers for pregnancy such as relaxin (RLN) and oestrone sulphate (E1S) are suggested to be produced by the fetal-placental unit as well as trophoblast cells and, therefore, they are considered superior, thus indicating an intact pregnancy. Serum concentrations of RLN increase after the second month of pregnancy from a basal concentration of 2.4 ng/ml to more than 25 ng/ml, then

Veterinary Record (2012)

doi: 10.1136/vr.100393

**J. Volkery**, BVetMed,  
**J. Gottschalk**, PhD,  
**A. Einspanier**, PhD, BVetMed,  
Faculty of Veterinary Medicine, Institute  
of Physiological Chemistry, University  
of Leipzig, An den Tierkliniken 1, Leipzig  
04103, Germany  
**A. Sobiraj**, PhD,  
Large Animal Clinic for Theriogenology  
and Ambulatory Services, Faculty of  
Veterinary Medicine, University of  
Leipzig, An den Tierkliniken 29, Leipzig  
04103, Germany

**T. Wittek**, PhD, Dipl. ECBHM,  
Department for Farm Animals and  
Veterinary Public Health, University of  
Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1,  
Vienna A-1210, Austria

E-mail for Correspondence:  
volkery@vmf.uni-leipzig.de  
einspanier@vmf.uni-leipzig.de

Provenance: not commissioned;  
externally peer reviewed

Accepted May 17, 2012

10.1136/vr.100393 | Veterinary Record | 1 of 5



## Papers

decrease from month 5 of gestation to approximately 5 ng/ml until month 8, at which point they again increase until parturition (Bravo and others 1996).

Concentrations of E1S increase between day 21 and 27 of gestation from a basal concentration of 1.15 ng/ml to 42 ng/ml in serum, and from 8 ng E1S/mg Cr to 75 ng E1S/mg Cr in urine, then return to basal values until month 11. During the last month of pregnancy, the concentrations again increase to 42 ng/ml in serum and 900 ng E1S/mg Cr in urine until parturition (Bravo and others 1996). Other authors describe a steady rise in plasma E1S concentration from 60 days before parturition with peak concentration during the last month of pregnancy (Aba and others 1998).

Except for Bravo and others (1995), who analysed plasma P4 concentrations of 176 alpacas postpartum and during early pregnancy, most of the published studies on hormone concentrations in SACs have been conducted on very few, often less than 10 animals.

To date, there are no studies on SACs published for measuring pregnancy-related hormones in saliva and milk. The use of milk, saliva and urine would simplify pregnancy diagnosis in alpacas since, in contrast to the current methods (eg, blood P4 concentration and ultrasonography), the owners themselves can extract the samples. The avoidance of blood sampling results in a considerable reduction in stress for the animals and, therefore, reduces the risk for potential loss of pregnancies. These methods would be especially helpful in early pregnancy diagnosis, because transcutaneous ultrasonography is unreliable for pregnancy detection up until day 40–50 after mating. The only viable method of pregnancy detection as early as day 19 of gestation is transrectal ultrasonography, but this technique is invasive and carries a risk of rectal wall perforation (Knauf and others 2008).

Since the measurement of P4 in milk and saliva of cattle (Gao and others 1988, Karg 1994) and in the milk of Old World camelids (Rahim and El-Nazier 1987) has already been described and is currently in use for pregnancy diagnosis, it may also be possible in SACs.

The objective of this study was to measure pregnancy-associated hormones in saliva, milk and urine of pregnant and non-pregnant alpacas, allowing comparison with blood concentrations, and assessment of their potential as non-invasive and reliable methods of pregnancy diagnosis in SACs.

## Materials and methods

### Animals and sampling

The study was performed on 36 female alpacas (33 Huacaya, 3 Suri) from six different private farms in Saxony, Germany, over a period of two years. The age ranged from 3 to 15 years (mean age 7.2 years  $\pm$  1.1 years).

Initial samples were collected from non-pregnant females before mating followed by 1–6 (3.89  $\pm$  0.35) samples from every mated female throughout pregnancy. The second sample was taken between day 11 and 67 post-mating (37.1  $\pm$  1.6 days), followed by sampling approximately every two months. Samples were obtained during routine veterinary visits, therefore, sampling days varied.

Only intact pregnancies (verified by ultrasonography) were included in the analysis. When embryonic losses occurred, sample collection resumed with new samples of the non-pregnant alpaca. At each sampling time, blood, saliva, milk (if the female was lactating) and, if possible urine, were obtained and pregnancy was confirmed via transcutaneous ultrasonography using a 5 MHz linear-array transducer (LOGIQ 100 Pro Vet, GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, USA).

Blood samples were collected by jugular venipuncture into EDTA tubes. Plasma was separated by centrifugation and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysed. Saliva was obtained from the oral cavity using special kits (Salivette, Sarstedt, Nümbrecht, Germany), centrifuged and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysed. Milk was obtained from 25 lactating females into tubes without preservative, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysed. Urine was collected from 22 females into tubes without preservative by the owner within 24 hours before blood sampling, and was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysed. Due to practical difficulties, milk and urine samples could not always be obtained from every animal.

### Hormone assays

Concentrations of P4 were measured by a modified enzyme immunoassay (EIA) described by Einspanier and Hodges (1994). The lowest amount of P4 detectable was 0.05 ng/ml, the intra-assay coefficient was 10.4 per cent, and the inter-assay coefficient was 10.3 per cent. Before the assay was performed, P4 was extracted from plasma and urine using petroleum ether, at the ratio of 1:10, from milk using absolute ethanol at the ratio of 1:5. The recovery rate was 97 per cent in plasma, 99 per cent in milk and 96 per cent in urine. Most saliva samples were used without extraction, but from some samples, P4 was also extracted using petroleum ether at the ratio of 1:10, and absolute ethanol at the ratio of 1:5.

Concentrations of PdG were measured following the same protocol as P4, but using specific PdG standards (P3635, Sigma, Steinheim, Germany), a PdG-specific antibody (R13904, Clinical Endocrinology Laboratory, UC Davis, California, USA) and enzyme (PdG:HRP, lot 12-11-2008, Clinical Endocrinology Laboratory, UC Davis, California, USA). The lowest amount of PdG detectable was 0.05 ng/ml, the intra- and inter-assay coefficients were 8.4 per cent and 14.2 per cent, respectively.

Concentrations of E1S were measured following the same protocol as P4, but by using specific E1S standards (Sigma, Steinheim, Germany), an E1S-specific antibody (R522-2, Clinical Endocrinology Laboratory, UC Davis, California, USA) and enzyme (E1S:HRP, Clinical Endocrinology Laboratory, UC Davis, California, USA). The lowest amount of E1S detectable was 0.05 ng/ml, the intra-assay coefficient was 9.1 per cent, the inter-assay coefficient 9.2 per cent. Before analysing, E1S was extracted from plasma and milk using absolute ethanol at the ratio of 1:5. The recovery rate was 110 per cent for plasma and 105 per cent for milk. Saliva and urine were used without extraction.

Concentrations of RLN were measured by a modified EIA described by Einspanier and others (1999). The lowest amount of RLN detectable was 0.025 ng/ml, the intra-assay coefficient was 21.5 per cent, the inter-assay coefficient was 18.2 per cent.

The volumes of samples needed for each test were 125  $\mu\text{l}$  of plasma, saliva and urine, and 50  $\mu\text{l}$  of milk, respectively.

All hormone assays were duplicated, and serial dilutions of alpaca plasma, saliva, milk and urine containing defined concentrations of the hormone were used to produce displacement curves parallel to the respective standard curve.

### Creatinine measurement

Urine concentrations of Cr were measured using an automatic analyser (Hitachi 912, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Concentrations of P4, PdG and E1S in urine were related to urine Cr concentration by calculating the ratio to eliminate variations in urine density.

### On-farm milk P4 kit

In addition to measurement of milk P4 concentration using EIA, a number of milk samples (pregnant:  $n=31$ ; non-pregnant:  $n=32$ ) were also tested for P4 using a commercial on-farm P4 kit, which was designed for dairy cattle (Hormonost, Biolab, Munich, Germany). The semi-quantitative ELISA-based test allows a differentiation between pregnant and non-pregnant animals based on a colour scale from blue (low P4 concentrations) to transparent (high P4 concentrations). Results were obtained by comparing the samples to two control samples provided with the kit. According to the manufacturer, the cut-off point for differentiation between pregnant and non-pregnant animals is 2 ng P4/ml.

### Analysis of data

Statistical analysis was performed using SPSS V.17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). A Q-Q plot was used to test for normal distribution; data of pregnant and non-pregnant animals were compared using the Wilcoxon rank-sum test for independent samples, and the Kruskal-Wallis test, respectively. P values  $<0.05$  were considered significant. Results are expressed as mean  $\pm$  se of the mean.

### Results

Concentrations of P4 in plasma ( $P<0.01$ ), milk ( $P<0.01$ ) and urine ( $P<0.05$ ) were significantly higher in pregnant than in



TABLE 1: Progesterone (P4) and pregnanediol-3-glucuronide (PdG) concentrations in different body fluids of pregnant and non-pregnant alpacas

	P4		PdG	
	Non-pregnant	Pregnant	Non-pregnant	Pregnant
Plasma	0.35±0.04 (n=37)	2.94±0.11* (n=117)	n/a	n/a
Saliva	2.38±0.34 (n=13)	3.01±0.32 (n=26)	4.48±0.99 (n=5)	5.42±0.92 (n=6)
Milk	0.83±0.06 (n=35)	4.09±0.38* (n=41)	n/a	n/a
Urine	0.29±0.04 (n=8)	0.60±0.06** (n=17)	26.70±2.80 (n=13)	152.73±17.37* (n=25)

Mean ± se of the mean in ng/ml (plasma, saliva, milk) or in ng/mg creatinine (urine). \*P<0.01; \*\*P<0.05

non-pregnant alpacas, whereas, there were no differences in saliva (Table 1).

Urine concentrations of PdG were significantly higher in pregnant alpacas (Table 1, P<0.01) and the pattern throughout pregnancy is similar to that of P4 in plasma (Fig 1). There was no significant change in saliva concentration of PdG throughout pregnancy (Table 1). The commercial on-farm P4 kit identified 28 of 31 milk samples of pregnant animals (confirmed by ultrasonography) correctly as pregnant (sensitivity 90 per cent). The three false-negative samples showed P4 milk concentrations between 1–2 ng/ml using the P4-EIA. The on-farm kit identified 22 of 32 milk samples from non-pregnant animals correctly as non-pregnant (specificity 69 per cent). However, seven of the 10 false-positive milk samples had P4 milk concentrations greater than 1 ng/ml using the EIA, whereas, the corresponding plasma concentrations were less than 1 ng/ml. Concentrations of RLN in plasma increased significantly after the second month of pregnancy (P<0.01), whereas, there were no significant differences in saliva and milk concentrations between pregnant and non-pregnant alpacas (Table 2). Urine concentrations of RLN were below the detection limit of EIA at any sampling time. Plasma (P<0.01) and urine (P<0.05) concentrations of E1S increased significantly during month 11 of pregnancy (Table 3). There was no significant difference in saliva E1S concentrations between pregnant and non-pregnant animals, and milk concentrations of E1S did not show any significant change throughout the whole lactation period (Table 3).

## Discussion

The objective of this study was to measure the pregnancy-associated hormones P4, PdG, E1S and RLN in saliva, milk and urine of alpacas, and to assess their potential for pregnancy diagnosis. For reference purposes, plasma concentrations of the hormones were also measured and compared with the obtained results.

The plasma P4 concentrations detected in this study are in agreement with previously reported data in SACs (Bravo 1994, Bravo and others 1996, Fowler and Bravo 1998). This confirms the possibility of using plasma P4 concentration for pregnancy diagnosis; low P4 values almost certainly rule out a pregnancy, whereas high plasma concentrations indicate the presence of active luteal tissue, which might indicate

pregnancy. In this study, saliva P4 concentrations were nearly identical in pregnant and non-pregnant animals. Since extraction media, such as petroleum ether and absolute ethanol produced the same saliva P4 results, saliva was used without extraction. This is in contrast with cattle, where saliva concentrations of P4 are well correlated with plasma concentrations (Gao and others 1988). The exact reason is so far unknown; it is possible that components in alpaca saliva (maybe from the forage or the forestomach) cause false-positive P4 results in the EIA. However, neither Engelhardt and Höller (1982) nor Ortiz and others (1974) found any significant differences in saliva composition between camelids and ruminants, but neither study tested for variations in enzyme activity.

Furthermore, there is no difference in saliva PdG concentrations between pregnant and non-pregnant animals, leading to the conclusion that measurement of P4 and PdG in saliva is not suitable for pregnancy diagnosis in SACs.

Urine P4 concentrations are significantly higher in pregnant than in non-pregnant animals (P<0.05). However, since all these values are within a narrow range, and there is a degree of overlap between pregnant (range 0.17–0.46 ng P4/mg Cr) and non-pregnant (range 0.26–1.17 ng P4/mg Cr) animals, it is problematic to establish cut-off values. Therefore, a precise differentiation between pregnant and non-pregnant SACs seems difficult to achieve using urine P4, even though with a detection limit of 0.05 ng/ml, the EIA can be considered very sensitive. The low values of P4 in urine can probably be explained by hepatic metabolism before excretion, as the metabolite PdG. This theory is supported by the results of this study, as urine concentrations of PdG were significantly higher in pregnant animals (P<0.01). The authors' data in alpacas partly agrees with the results of previous studies in five llamas (Bravo and others 1991a), which reported similar basal concentrations of PdG in urine five days post-partum and during early pregnancy. However, the present study did not find the increase in PdG concentration during the final 20 days of pregnancy reported by these authors. This might be due to a species difference between llamas and alpacas, or just a coincidental finding due to the low number of llamas. Surprisingly, another study by the same authors (Bravo and others 1991b) detected much lower basal PdG concentrations (0.6 ng PdG/mg Cr) in llamas and alpacas, but this was not found in any of the samples analysed in this study. The decrease in PdG urine concentrations, which does not equally correspond with P4 concentrations in plasma, is probably due to the low number of urine samples. Urine sampling proved to be difficult in many of the alpacas, because stimulation of urination was often unsuccessful and obtaining urine was very time consuming, or not possible at all. Chances of success may be improved by training of the alpacas.

Concentrations of P4 in milk are significantly higher in pregnant animals (P<0.01) and, therefore, measurement of P4 in milk has the

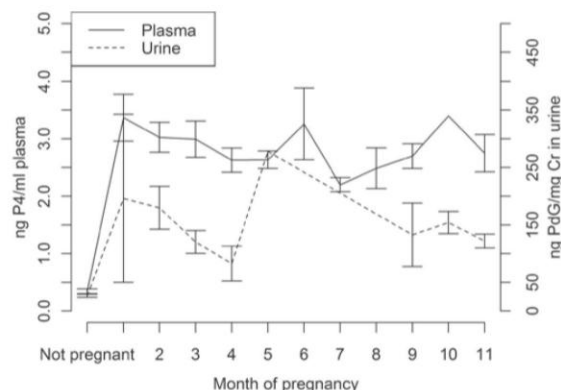


FIG 1: Progesterone (P4) concentrations in plasma and pregnanediol-3-glucuronide (PdG) concentrations in urine of female alpacas throughout pregnancy. Mean ± se of the mean

TABLE 2: Relaxin concentrations in different body fluids of pregnant and non-pregnant alpacas

	Days of pregnancy		
	Non-pregnant	1–60	>60
Plasma	1.65±0.56 (n=28)	2.65±1.06 (n=23)	11.69±2.31* (n=30)
Saliva	0.19±0.05 (n=19)	0.15±0.03 (n=12)	0.10±0.02 (n=17)
Milk	3.06±0.27 (n=3)	2.19±0.27 (n=3)	3.13±0.31 (n=4)

Mean ± se of the mean in ng/ml. \*P<0.01



Papers

TABLE 3: Oestrone sulphate (E1S) concentrations in different body fluids of pregnant and non-pregnant alpacas

	Non-pregnant	Month of pregnancy	
		1-10	11
Plasma	0.59±0.07 (n=31)	0.59±0.03 (n=103)	3.43±0.55* (n=13)
Saliva	0.52±0.11 (n=5)	0.38±0.05 (n=12)	0.33±0.07 (n=6)
Urine	6.14±0.53 (n=11)	8.82±1.40 (n=17)	104.03±24.09** (n=4)
Milk	0.60±0.12 (n=3)	0.52±0.45 (n=13)	n/a

Mean ± se of the mean in ng E1S/mg creatinine. Lactation and therefore milk sampling ceased after month 6 of pregnancy. \*P<0.01 \*\*P<0.05

potential to be used as a marker for pregnancy in SACs. To the authors' knowledge, this is the first study regarding milk P4 in SACs. The findings of the present study are in agreement with previous studies in other species, which measured P4 concentrations in milk of dairy cattle, small ruminants (Gao and others 1988, Dionysius 1991) and Old World camelids (Rahim and El-Nazier 1987, Rahim 1989) at different stages of the oestrus cycle, and during pregnancy.

P4 on-farm kit showed a sensitivity of 90 per cent, and a specificity of 69 per cent in this study. However, all samples detected as false-negative using the kit had P4 concentrations between 1 and 2 ng/ml in the EIA and, therefore, they were below the detection limit of the kit. A total of 70 per cent of the samples detected as false-positive, using the kit, had milk P4 concentrations >1 ng/ml, but plasma P4 concentrations <1 ng/ml, therefore, would also have been classified as 'pregnant' using milk EIA, but would have been correctly classified as 'non-pregnant' using plasma P4.

Potentially, the accuracy of milk P4 could be improved by eliminating negative effects like transportation and freezing, by testing the samples shortly after collection, but since being optimised for dairy cattle, and a detection limit not ideal for use in SACs, the kit cannot provide perfect precision. However, although the methods for milk P4 have to be optimised for the alpaca, this study shows its potential in pregnancy diagnosis. The on-farm kit could be very useful as a first on-farm indicator, especially during early pregnancy.

Plasma concentrations of RLN increase significantly after the second month of pregnancy, which is in agreement with previous reports in llamas and alpacas (Bravo and others 1996) (P<0.01). There were no significant differences in RLN concentrations in saliva and urine between pregnant and non-pregnant animals, with all values either very low (saliva) or below the detection limit of the EIA (urine). The method of extracting RLN from urine, as described in felids by van Dorsser and others (2006), could not be reproduced in the authors' laboratory. Either RLN is not excreted in saliva and urine in the alpaca or, being a peptide hormone, it has already been denatured by proteolytic enzymes. Though there were measureable RLN concentrations in milk, the values showed no significant differences between pregnant and non-pregnant animals. Reported data in other species, like pigs (Yan and others 2006), rats (Steinetz and others 2009) and dogs (Goldsmith and others 1994) indicates that RLN in milk might be produced by the mammary glands independent of a CL and, therefore, of plasma concentration. Hence, its use in pregnancy diagnosis remains questionable.

Plasma and urine concentrations of E1S increased significantly during the last month of pregnancy, but maximum values stayed considerably below values reported by Bravo and others (1996). The peak of E1S between day 21 and 27 of pregnancy described by these authors could not be found in the present study, probably due to vague information from the breeder regarding the successful mating date and the small number of samples (n=7) taken during this period. Some females were mated several times until rejection of the male, and the last date was considered the successful one. It is therefore not possible to accurately date the gestation length to within such a short time-frame. In order to assess if this E1S peak was missed by the sampling in the present study, or if there was no peak, further studies focusing on this time-frame of pregnancy are necessary.

Milk concentrations of E1S did not differ significantly at any sampling time, but since lactation had ceased in all animals by the time plasma concentrations increased, no conclusion could be drawn as to

whether E1S is excreted in the milk of SACs. Given that determination of E1S in the milk of cows is possible and usable for pregnancy diagnosis, (Henderson and others 1994, Zdunczyk and others 2002) it is also likely to be possible in SACs. However, the usefulness for pregnancy diagnosis depends on whether the early E1S peak described by Bravo and others (1996) can be confirmed. There were no significant differences in saliva concentrations of E1S at any sampling time. In contrast with other species like pigs (Ohtaki and others 1997) and seals (Pietraszek and Atkinson 1994), where E1S can be detected in saliva, apparently, it is not excreted in alpaca saliva, or has already been denatured.

## Conclusions

Saliva is not useful for pregnancy diagnosis in alpacas. Milk P4 and urine PdG, on the other hand, seem to be useful alternatives to invasive methods of pregnancy diagnosis, such as blood sampling. A commercial milk P4 on-farm kit designed for dairy cattle gave a moderate diagnostic accuracy in alpacas. Since high P4 concentrations only indicate active luteal tissue, false-positive interpretations of findings are possible, for example, in the presence of a persistent CL. Therefore, pregnancy should be confirmed using transcutaneous ultrasonography. Urine and milk RLN concentrations were found to be unsuitable for pregnancy diagnosis. The measurement of E1S in urine is possible, but further studies during the first month of pregnancy are required to assess the value of urine E1S, and milk E1S, in early pregnancy diagnosis in SACs.

## Acknowledgements

T. Wittek and A. Einspanier contributed equally to this paper. The authors would like to thank the German alpaca breeder associations: AA e.V. (Alpaca Association), NWK e.V. (Verein der Züchter, Halter und Freunde von Neuweltkameliden) and AZVD (Alpaka Zucht Verband Deutschland) and its members for their financial support and cooperation. The authors also thank JProf. Dr. Uwe Ligges and Mrs. Ieva Zelo at SBAZ, TU Dortmund University for their help with the statistical analysis, and their colleagues at the Institute of Physiological Chemistry in Leipzig for their assistance in collecting the data.

## References

- ABA, M. A., SUMAR, J., KINDAHL, H., FORSBERG, M. & EDOVIST, L.-E. (1998) Plasma concentrations of 15-ketodihydro-PGE<sub>2</sub> 2a progesterone, oestrone sulphate, oestradiol-17b and cortisol during late gestation, parturition and the early post partum period in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science* **50**, 111-121.
- BRAVO, P. W., STABENFELDT, G. H., FOWLER, M. E. & LASLEY, B. L. (1991a) Urinary steroids in the periparturient and postpartum periods through early-pregnancy in llamas. *Theriogenology* **36**, 267-278.
- BRAVO, P. W., STABENFELDT, G. H., LASLEY, B. L. & FOWLER, M. E. (1991b) The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South-American Camelids. *Biology of Reproduction* **45**, 553-559.
- BRAVO, P. W. (1994) Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **10**, 265-279.
- BRAVO, P. W., PEZO, D. & ALARCON, V. (1995) Evaluation of early reproductive performance in the postpartum alpaca by progesterone concentrations. *Animal Reproduction Science* **39**, 71-77.
- BRAVO, P. W., STEWART, D. R., LASLEY, B. L. & FOWLER, M. E. (1996) Hormonal indicator of pregnancy in llamas and alpacas. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **208**, 2027.
- BROWN, B. W. (2000) A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science* **58**, 169-195.
- DIONYSIUS, D. A. (1991) Pregnancy diagnosis in dairy goats and cows using progesterone assay kits. *Australian Veterinary Journal* **68**, 14-16.
- EINSPANIER, A. & HODGES, J. K. (1994) LH- and chorionic gonadotropin-stimulated progesterone release in-vitro by intact luteal tissue of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Journal of Endocrinology* **141**, 403-409.
- EINSPANIER, A., NUBBEMEYER, R., SCHLOTE, S., SCHUMACHER, M., IVELL, R., FUHRMANN, K. & MARTEN, A. (1999) Relaxin in the marmoset monkey: Secretion pattern in the ovarian cycle and early pregnancy. *Biology of Reproduction* **61**, 512-520.
- ENGELHARDT, W. V. & HÖLLER, H. (1982) Salivary and gastric physiology of camelids. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft* **1982**, 195-204.
- FERNANDEZ-BACA, S., HANSEL, W. & NOVOA, C. (1970a) Corpus luteum function in the alpaca. *Biology of Reproduction* **3**, 252-261.
- FERNANDEZ-BACA, S., HANSEL, W. & NOVOA, C. (1970b) Embryonic mortality in the alpaca. *Biology of Reproduction* **3**, 243-251.
- FOWLER, M. E. & BRAVO, P. W. (1998) Reproduction. In *Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuna, Guanaco*. Ed M. E. Fowler. Iowa State University Press. pp 381-429.

- GAO, Y., SHORT, R. V. & FLETCHER, T. P. (1988) Progesterone concentrations in plasma, saliva and milk of cows in different reproductive states. *British Veterinary Journal* **144**, 262–268
- GOLDSMITH, L. T., LUST, G. & STEINETZ, B. G. (1994) Transmission of relaxin from lactating bitches to their offspring via suckling. *Biology of Reproduction* **50**, 258–265
- HENDERSON, K. M., CAMBERIS, M., SIMMONS, M. H., STARRS, W. J. & HARDIE, A. H. M. (1994) Application of enzyme-immunoassay to measure estrone sulfate concentrations in cows milk during pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **50**, 189–196
- KARG, H. (1994) Hormonanalytische Kontrolle von Fortpflanzungsfunktionen. In *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Aufl. Ed E Döcke. Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart. pp 766–783
- KNAUE, S., SCHWALM, A. & WEHREND, A. (2008) Physiology of reproduction in domesticated South American camelids. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere/Nutztiere* **36**, 313–318
- OHTAKI, T., MORIYOSHI, M., NAKADA, K., NAKAO, T. & KAWATA, K. (1997) Radioimmunoassay of saliva estrone sulfate in pregnant sows. *Journal of Veterinary Medical Science* **59**, 759–763
- ORTIZ, C., CAVERO, J., SILLAU, H. & CUEVA, S. (1974) The parotid saliva of the alpaca (*Lama pacos*). *Research in Veterinary Science* **16**, 54–56
- PIETRASZEK, J. & ATKINSON, S. (1994) Concentrations of estrone sulfate and progesterone in plasma and saliva, vaginal cytology, and bioelectric impedance during the estrous-cycle of the Hawaiian Monk Seal (*Monachus-Schaumslandi*). *Marine Mammal Science* **10**, 430–441
- RAHIM, S. E. A. A. & EL-NAZIER, A. E. (1987) Estimation of progesterone level in camels' (*Camelus dromedarius*) milk and its application in pregnancy diagnosis. *British Veterinary Journal* **143**, 555–559
- RAHIM, S. E. A. A. (1989) The use of milk progesterone analysis to monitor reproductive activity in the camel (*Camelus dromedarius*). *British Veterinary Journal* **145**, 23–27
- STEINETZ, B. G., HORTON, L. & LASANO, S. (2009) The source and secretion of immunoactive relaxin in rat milk. *Experimental Biology and Medicine* **234**, 562–565
- VAN DORSSER, E. J. D., SWANSON, W. E., LASANO, S. & STEINETZ, B. G. (2006) Development, validation, and application of a urinary relaxin radioimmunoassay for the diagnosis and monitoring of pregnancy in felids. *Biology of Reproduction* **74**, 1090–1095
- YAN, W. B., WILEY, A. A., BATHGATE, R. A. D., FRANKSHUN, A. L., LASANO, S., CREAN, B. D., STEINETZ, B. G., BAGNELL, C. A. & BARTOL, E. E. (2006) Expression of LGR7 and LGR8 by neonatal porcine uterine tissues and transmission of milk-borne relaxin into the neonatal circulation by suckling. *Endocrinology* **147**, 4303–4310
- ZDUNCZYK, S., JANOWSKI, T. & MALECKI-TEPICH, J. (2002) Determination of estrone sulphate in milk for pregnancy diagnosis in cows. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Grosstiere/Nutztiere* **30**, 75–78

#### 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie sollten die Konzentrationen trächtigkeitsassoziierter Hormone in Speichel, Milch und Urin von Alpakas im Vergleich zur jeweiligen Blutkonzentration bestimmt werden, mit dem Ziel ihre Eignung zur nicht invasiven Trächtigkeitsdiagnostik zu untersuchen. Bei allen analysierten Hormonen gibt es keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen Serum und Plasma der jeweiligen Tiere, so dass im Folgenden nur von der Blutkonzentration gesprochen wird.

Die gemessenen Blutkonzentrationen von P4 stimmen mit früheren Untersuchungsergebnissen an NWK überein (BRAVO 1994; BRAVO et al. 1996; FOWLER und BRAVO 1998). Somit kann P4 im Blut als Trächtigkeitsmarker beim Alpaka bestätigt werden: Niedrige P4-Werte schließen eine Trächtigkeit mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit aus, während hohe Werte einen aktiven Gelbkörper anzeigen und somit eine Verdachtsdiagnose „tragend“ zulassen. Im Speichel dagegen zeigen gravide und ingravide Tiere nahezu identische P4-Werte. Da auch Extraktionsversuche mittels Petrolether und mit absolutem Ethanol dieselben Speichel-P4-Konzentrationen ergaben, wurden Speichelproben anschließend ohne Extraktion untersucht. Im Gegensatz zu Kühen, wo die Speichelkonzentration von P4 mit der Plasmakonzentration korreliert (GAO et al. 1988), scheint im Alpaka-Speichel eine Komponente, eventuell aus dem Futter oder dem Vormagen, enthalten zu sein, die im EIA zu falsch positiven P4-Ergebnissen führt. Weder ORTIZ et al. (1974) noch ENGELHARDT und HÖLLER (1982) fanden signifikante Unterschiede in der Elektrolytzusammensetzung oder im pH-Wert von Speichel zwischen Kameliden und Wiederkäuern. Jedoch untersuchte keine dieser Studien eventuelle Unterschiede hinsichtlich Enzymmuster und -Aktivität. Auch im PdG-Gehalt gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen tragenden und nicht tragenden Tieren, so dass die Bestimmung von P4 bzw. dessen Metabolit PdG im Alpakaspeichel zur Trächtigkeitsdiagnostik nicht geeignet ist.

Die P4-Konzentration im Urin tragender Tiere ist im Vergleich zu nicht tragenden Tieren signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Da die Absolutwerte aber sehr niedrig sind und derart nahe beieinander liegen, dass selbst im eingesetzten Assay, der mit einer Nachweisgrenze von 0,05 ng/ml als sehr empfindlich bezeichnet werden kann, eine sichere Unterscheidung zwischen graviden und ingraviden Tieren nicht gewährleistet werden kann, ist die P4-Bestimmung im Urin für die Praxis ungeeignet. Ursache für die niedrigen P4-Werte im Urin ist wahrscheinlich die Metabolisierung von P4 in der Leber, so dass die Ausscheidung im Urin hauptsächlich als PdG erfolgt. Dafür sprechen die in dieser Studie gemessenen Urinwerte von PdG: Sie sind signifikant höher bei graviden als bei ingraviden Tieren ( $p < 0,01$ ). Unsere Werte beim Alpaka stimmen teilweise mit früheren Untersuchungen von BRAVO et al. (1991a) überein, die an fünf Lamas erho-

## DISKUSSION

ben wurden, wo 5 Tage post partum Basalwerte von  $36,0 \pm 5,2$  ng PdG/mg Krea und in der frühen Trächtigkeit Werte von  $132,5 \pm 16,1$  ng PdG/mg Krea gemessen wurden. Der dort in den letzten 20 Tagen der Trächtigkeit beobachtete Anstieg der Hormonkonzentrationen auf  $209,5 \pm 26,6$  ng PdG/mg Krea konnte in unseren Studien jedoch nicht festgestellt werden, was entweder in einem tierartspezifischen Unterschied zwischen Lamas und Alpakas oder in der niedrigen Tierzahl von 5 Stuten begründet sein kann. Interessanterweise wurden im selben Jahr in einer weiteren Studie derselben Forschergruppe (BRAVO et al. 1991b) bei Lamas und Alpakas deutlich niedrigere Basalwerte (0,6 ng PdG/mg Krea) angegeben. Diese Werte konnten in unserer Studie nicht bestätigt werden. Eine Trächtigkeitsdiagnose mittels Bestimmung von PdG im Urin ist also den eigenen Studien zufolge aussagefähig. Problematisch stellt sich jedoch die Gewinnung der Urinproben dar, da eine Provokation der Stuten zum Harnabsatz nicht möglich war und unkooperative Tiere das Auffangen von Spontanharn oft sehr zeitaufwändig oder gar unmöglich machten. Eventuell lässt sich dies durch Training und Gewöhnung der Tiere verbessern.

Der P4-Gehalt ist in Milch tragender Tiere signifikant höher als bei nicht tragenden ( $p < 0,01$ ). Dies korreliert gut mit Untersuchungen bei anderen Tierarten, nach denen die P4-Bestimmung in Milch von Kühen und kleinen Wiederkäuern (GAO et al. 1988; DIONYSIUS 1991) sowie von Altweltkamelen (RAHIM und EL-NAZIER 1987; RAHIM 1989) hilfreich zur Zyklus- und Trächtigkeitsdiagnostik genutzt wird. Die P4-Bestimmung in Milch ist somit auch zur Trächtigkeitsdiagnose beim Alpaka geeignet.

Der in der vorliegenden Studie getestete P4-Schnelltest für Milchkühe zeigt mit einer Genauigkeit von 90% tragende bzw. 69% nicht tragende Tiere richtig an. Im Schnelltest falsch negativ beurteilte Proben zeigen alle im EIA P4-Werte zwischen 1 und 2 ng/ml und liegen somit unter der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze von 2 ng/ml. Von den im Schnelltest falsch positiv beurteilten Milchproben zeigen 70% im EIA P4-Konzentrationen von  $> 1$  ng/ml und würden somit ebenfalls falsch positiv oder zumindest als fraglich beurteilt werden. Die entsprechenden Blutproben weisen im EIA jedoch Konzentrationen  $< 1$  ng/ml auf und würden somit richtigerweise als nicht tragend beurteilt. Möglicherweise kann die Genauigkeit des Schnelltests verbessert werden, indem Einflüsse durch Transport und Einfrieren der Proben, welchen alle eingesetzten Proben unterworfen waren, minimiert und gewonnene Milchproben zeitnah im Stall untersucht werden. Jedoch ist der Schnelltest für die Anwendung in der Zyklusdiagnostik bei Milchkühen optimiert und die gewählte Nachweisgrenze für das Alpaka nicht optimal, so dass er beim Alpaka derzeit keine hundertprozentige Genauigkeit liefern kann. Unsere Untersuchungen zeigen aber, dass er v. a. in der Frühträchtigkeit für den Züchter geeignet ist, um vor Ort eine erste frühe Verdachtsdiagnose zu stellen.

## DISKUSSION

Ein signifikanter Anstieg der RLN-Blutkonzentration erfolgt erst nach Tag 60 der Trächtigkeit ( $p < 0,01$ ), was mit früheren Untersuchungen in Lamas und Alpakas übereinstimmt (BRAVO et al. 1996). Speichel- und Urinkonzentrationen von RLN weisen dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen tragenden und nicht tragenden Tieren auf, mit allen Werten entweder sehr niedrig (Speichel) oder unter der Nachweisgrenze (Urin). Entweder wird RLN in diesen Körperflüssigkeiten nicht ausgeschieden oder, da es sich um ein Peptid-Hormon handelt, wurde es bereits durch proteolytische Enzyme abgebaut. Die Extraktionsmethode von RLN, wie sie von V. DORSSER et al. (2006) im Urin von Wildkatzen beschrieben wurde, konnte in unserem Labor nicht reproduziert werden. Somit scheint die RLN-Bestimmung in Speichel und Urin beim Alpaka zur Trächtigkeitsdiagnose nicht geeignet.

In Milch sind zwar messbare RLN-Konzentrationen vorhanden, es gibt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen tragenden und nicht tragenden Tieren. Da Studien in anderen Tierarten wie Schweinen (YAN et al. 2006), Ratten (STEINERTZ 2009) und Hunden (GOLDSMITH 1994) den Schluss nahelegen, dass RLN in der Milchdrüse selbst, unabhängig von einer Trächtigkeit und der Plasmakonzentration produziert wird, bleibt die mögliche Nutzbarkeit zur Trächtigkeitsdiagnose fraglich.

Plasma- und Urinkonzentrationen von E1S steigen signifikant im letzten Trächtigkeitsmonat an ( $p < 0,01$ ), bleiben aber deutlich unter Maximalwerten, wie sie von BRAVO et al. (1996) gemessen wurden. Weiterhin konnte der von diesen Autoren gemessene Konzentrationsanstieg zwischen Tag 21 und 27 der Trächtigkeit in der vorliegenden Studie nicht nachvollzogen werden, was jedoch in ungenauen Angaben der Züchter zum tatsächlichen Deckzeitpunkt sowie in der geringen Probenanzahl ( $n = 7$ ) während dieses Zeitraumes begründet sein kann. Der Großteil der Stuten wurde mehrmals vom Hengst gedeckt, und der letzte Deckakt wurde als der erfolgreiche angenommen. Somit war es nicht immer möglich, den exakten Zeitpunkt der Trächtigkeit in Tagen anzugeben, und wahrscheinlich wurde die sehr kurze Spanne des E1S-Peaks von den Probennahmen gelegentlich verpasst. Um festzustellen, ob dieser Peak vorhanden ist, sind weitere Studien nötig, die sich auf diesen Zeitraum konzentrieren.

E1S-Konzentrationen im Speichel unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant. Im Gegensatz zu anderen Tierarten wie Schweinen (OHTAKI 1997) und Seehunden (PIETRASZEK 1994), bei denen E1S im Speichel nachgewiesen werden kann, wird es anscheinend nicht im Alpakaspeichel ausgeschieden oder wurde bereits von Enzymen abgebaut und ist somit zur Trächtigkeitsdiagnose beim Alpaka nicht geeignet.

Es gibt keinen signifikanten Unterschied in der Milchkonzentration von E1S zwischen tragenden und nicht tragenden Tieren. Jedoch war zu dem Zeitpunkt, als die Blutkonzentrationen im letzten Trächtigkeitsmonat anstiegen, bei allen Tieren die Laktation

## DISKUSSION

bereits beendet, so dass keine Aussage mehr über die Nutzbarkeit von Milch als Substrat getroffen werden kann. Da die Messung von E1S in Milch von Kühen möglich ist und in der Trächtigkeitsdiagnostik Anwendung findet (HERNDERSON 1994; ZDUNCZYK 2002), liegt die Vermutung nahe, dass E1S auch in Milch von Neuweltkameliden nachweisbar ist. Ob die Nutzung zur Trächtigkeitsdiagnose möglich ist, hängt davon ab, ob der frühe E1S-Anstieg, den BRAVO et al. (1996) beschrieben haben, bestätigt werden kann.

### Fazit für die Praxis:

Die P4-Bestimmung in Milch stellt ebenso wie die PdG-Bestimmung im Urin eine geeignete Alternative zu invasiven Methoden der Trächtigkeitsdiagnostik, wie der Blutprobenentnahme beim Alpaka dar. Der Einsatz eines kommerziell erhältlichen P4-Schnelltests für Milchkühe ergab eine moderate diagnostische Genauigkeit und eignet sich v. a. für den Züchter, um vor Ort eine erste Verdachtsdiagnose stellen zu können. Da eine hohe P4-Konzentration letztendlich aktives Lutealgewebe reflektiert, sind falsch positive Ergebnisinterpretationen, z. B. beim Vorhandensein eines persistierenden Gelbkörpers, durchaus möglich. Daher sollte die Diagnose „sicher tragend“ bzw. „sicher nicht tragend“ zu einem späteren Zeitpunkt durch eine transabdominale Ultraschalluntersuchung verifiziert werden.

Die Bestimmung von RLN in Milch und Urin scheint ebenso wie das Medium Speichel zur Trächtigkeitsdiagnostik beim Alpaka ungeeignet zu sein. Der Nachweis von E1S im Urin ist möglich, jedoch sind weitere Studien v. a. während des 1. Trächtigkeitsmonats nötig, um die Nutzbarkeit von E1S in Urin und in Milch zur verlässlichen Diagnose einer Frühträchtigkeit zu prüfen.



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Janine Volkery

Trächtigkeitsdiagnostik bei Alpakas mittels nicht invasiver Methoden

Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut und Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und Klinik für Wiederkäuer der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Eingereicht im November 2012

32 Seiten, 5 Abbildungen, 4 Tabellen, 37 Literaturangaben, 1 Anhang

Schlüsselwörter: Neuweltkameliden, Trächtigkeitsdiagnose, Hormone, Speichel, Milch, Urin

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die trächtigkeitsassoziierten Hormone Progesteron (P4), Pregnanediol-Glucuronid (PdG), Östronsulfat (E1S) und Relaxin (RLN) in Speichel, Milch und Urin von tragenden und nicht tragenden Alpakas im Vergleich zur jeweiligen Blutkonzentration zu bestimmen, um ihre Eignung zur nicht invasiven Trächtigkeitsdiagnostik zu untersuchen.

Beprobt wurden, über einen Zeitraum von zwei Jahren, 36 Alpakastuten von sechs privaten Züchtern in Sachsen jeweils vor der Bedeckung und in verschiedenen Stadien der Trächtigkeit (verifiziert durch eine transabdominale Ultraschalluntersuchung). Es wurden jeweils Serum-, Plasma-, Speichel-, Urin- und Milchproben gewonnen und die Hormonkonzentrationen mittels Enzymimmunoassay (EIA) bestimmt. Weiterhin wurden einige Milchproben in einem semiquantitativen Progesteron-Schnelltest für Rinder eingesetzt.

P4-Konzentrationen steigen signifikant von Basalwerten beim nicht tragenden Tier von  $0,35 \pm 0,04$  ng/ml auf  $2,94 \pm 0,11$  ng/ml Plasma (bzw. von  $0,26 \pm 0,03$  auf  $2,87 \pm 0,10$  ng/ml Serum) bei tragenden Tieren an.

Auch in Milch und im Urin tragender Alpakas sind signifikant höhere P4-Konzentrationen messbar: Sie steigen von basal  $0,83 \pm 0,06$  ng/ml auf  $4,09 \pm 0,38$  ng/ml Milch bzw. von  $0,29 \pm 0,04$  ng P4/mg Krea auf  $0,60 \pm 0,06$  ng P4/mg Krea im Urin. Die Urin-Konzentrationen von PdG sind signifikant höher bei graviden ( $152,73 \pm 17,37$  ng PdG/mg Krea) als bei ingraviden Alpakas ( $26,70 \pm 2,80$  ng PdG/mg Krea).

Im Speichel sind weder von P4 noch von PdG Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Gruppen nachweisbar. Der P4-Schnelltest erkannte 28 von 31 Milchproben tragender Tiere richtig als tragend, was einem Prozentsatz von 90 % entspricht. Dage-

## ZUSAMMENFASSUNG

gen wurden 22 von 32 Proben nicht tragender Tiere als nicht tragend identifiziert (69 %), wobei von den falsch positiven Milchproben jedoch 70% auch mit dem laborgebundenen EIA falsch positive Ergebnisse lieferten.

Während Blutkonzentrationen von RLN signifikant nach dem zweiten Trächtigkeitsmonat von basal  $1,65 \pm 0,56$  ng/ml auf  $11,69 \pm 2,31$  ng/ml (Plasma) bzw. von  $0,95 \pm 0,30$  ng/ml auf  $16,23 \pm 3,05$  ng/ml (Serum) ansteigen, sind keine Unterschiede in Milch, Speichel und Urin zwischen tragenden und nicht tragenden Tieren nachweisbar.

Konzentrationen von E1S steigen erst im letzten Trächtigkeitsmonat signifikant an: Blutwerte steigen von basal  $0,59 \pm 0,07$  ng/ml auf  $3,43 \pm 0,55$  ng/ml (Plasma) bzw.  $0,32 \pm 0,02$  ng/ml auf  $2,16 \pm 0,43$  ng/ml (Serum) und Urinwerte von basal  $6,14 \pm 0,53$  ng E1S/mg Krea auf  $104,03 \pm 24,09$  ng E1S/mg Krea. Speichel und Milchkonzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen.

Die gemessenen Konzentrationen von P4, E1S und RLN im Blut bzw. PdG und E1S im Urin stimmen mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein und können somit als Trächtigkeitmarker bestätigt werden.

Dies ist die erste Arbeit, die trächtigkeitsassoziierte Hormone in Speichel und Milch von Alpakas untersucht. Während die P4 Bestimmung in Milch sowie die Bestimmung von PdG und E1S in Urin geeignete Alternativen darstellen, ist Speichel für eine Trächtigkeitsdiagnostik beim Alpaka ungeeignet.

Die Nutzung von Milch und Urin zur Trächtigkeitsdiagnose stellt insofern eine Vereinfachung der derzeit gängigen Methoden (u. a. Blutprogesteron) dar, als dass der Besitzer das Probenmaterial selbst gewinnen kann und dies mit erheblich weniger Stress für die Stuten verbunden ist. Die Bestimmung von P4 in Milch und PdG in Urin stellen somit geeignete Alternativen zur Frühdiagnostik im ersten Trächtigkeitsmonat dar, da zu diesem Zeitpunkt eine transabdominale Ultraschalluntersuchung noch nicht aussagekräftig ist.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag, um die noch vergleichsweise kleine vorhandene Datenbank zur Endokrinologie der Reproduktion bei NWK zu erweitern.



## SUMMARY

### 6 SUMMARY

Janine Volkery

Pregnancy diagnosis in New World Camelids using non-invasive methods

Institute of Physiological Chemistry and Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Germany and Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria

Submitted in November 2012

32 pages, 5 figures, 4 tables, 37 references, 1 appendix

Keywords: New World camelids, pregnancy diagnosis, hormones, saliva, milk, urine

Aims of the present study were the measurement of pregnancy-associated hormones progesterone (P4), pregnanediol-glucuronide (PdG), relaxin (RLN) and oestrone sulphate (E1S) in saliva, milk and urine of pregnant and non-pregnant alpacas, to compare to their respective blood concentrations and to assess their potential use for pregnancy diagnosis.

Samples were obtained over a course of two years from 36 female alpacas of 6 private alpaca breeders in Saxony (Germany) before mating and at different stages throughout pregnancy (confirmed by ultrasonography). Hormone concentrations in serum, plasma, saliva, urine and milk samples were determined using enzyme immunoassays (EIA). Some milk samples were also tested using a commercial on-farm P4 kit which is designed for dairy cattle.

Concentrations of P4 increased significantly from basal values in non-pregnant alpacas of  $0.35 \pm 0.04$  ng/ml to  $2.94 \pm 0.11$  ng/ml in plasma (and from  $0.26 \pm 0.03$  to  $2.87 \pm 0.10$  ng/ml in serum) in pregnant animals. Milk and urine concentrations of P4 were significantly higher in pregnant alpacas: Values increased from basal  $0.83 \pm 0.06$  ng/ml to  $4.09 \pm 0.38$  ng/ml in milk and from  $0.29 \pm 0.04$  ng P4/mg Cr to  $0.60 \pm 0.06$  ng P4/mg Cr in urine.

While PdG concentrations in urine were significantly higher in pregnant ( $152.73 \pm 17.37$  ng PdG/mg Cr) than in non-pregnant animals ( $26.70 \pm 2.80$  ng PdG/mg Cr), there were no differences in concentrations of P4 or PdG in saliva.

The on-farm milk P4 test kit showed a sensitivity of 90% for diagnosis of pregnancy and a specificity of 69% for non-pregnancy.

## SUMMARY

RLN concentrations in blood increased significantly after the 2nd month from basal  $1.65 \pm 0.56$  ng/ml to  $11.69 \pm 2.31$  ng/ml in plasma and from  $0.95 \pm 0.30$  ng/ml to  $16.23 \pm 3.05$  ng/ml in serum, whereas there were no differences in milk, saliva and urine between pregnant and non-pregnant animals.

Hormone concentrations of E1S increase during the last month of pregnancy: Blood concentrations rise from basal values of  $0.59 \pm 0.07$  ng/ml to  $3.43 \pm 0.55$  ng/ml in plasma and from  $0.32 \pm 0.02$  ng/ml to  $2.16 \pm 0.43$  ng/ml in serum; urine concentrations from  $6.14 \pm 0.53$  ng E1S/mg Cr to  $104.03 \pm 24.09$  ng E1S/mg Cr. There were no significant differences in E1S concentrations in saliva and milk between pregnant and non-pregnant alpacas.

Values of P4, E1S and RLN in blood as well as PdG and E1S in urine are comparable to previous reports in alpacas and therefore can be confirmed as an indicator for pregnancy.

This is the first study to include determination of pregnancy associated hormones in saliva and milk of alpacas. However, saliva seems to be unsuitable for pregnancy diagnosis in alpacas, whereas P4 in milk, as well as PdG and E1S in urine seem to be adequate tools.

The use of milk and urine would simplify pregnancy diagnosis in alpacas since, in contrast to the current methods (e.g. blood P4 concentration and ultrasonography), the owners themselves can take the samples. The avoidance of blood sampling results in a considerable stress reduction for the animals and therefore reduces the risk for potential loss of pregnancies. The measurements of P4 in milk and PdG in urine are useful alternatives to pregnancy diagnosis, especially during the first month of pregnancy, when transcutaneous ultrasonography is not yet reliable.

This work adds information to the comparatively small database for camelid reproductive endocrinology.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Aba MA, Forsberg M, Kindahl H, Sumar J, Edqvist LE. Endocrine changes after mating in pregnant and non-pregnant llamas and alpacas. *Acta Vet Scand.* 1995;36(4):489-98.

Adams GP, Ratto, MH, Collins, CW, Bergfelt, DR. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology* 2009;71:166-75

Bravo PW. Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1994;10(2):265-79.

Bravo PW, Fowler ME, Stabenfeldt GH, Lasley BL. Ovarian Follicular Dynamics in the Llama. *Biol Reprod.* 1990;43(4):579-85.

Bravo PW, Stabenfeldt GH, Fowler ME, Lasley BL. Urinary Steroids in the Periparturient and Postpartum Periods Through Early-Pregnancy in Llamas. *Theriogenology* 1991a;36(2):267-78.

Bravo PW, Stabenfeldt GH, Lasley BL, Fowler ME. The Effect of Ovarian Follicle Size on Pituitary and Ovarian Responses to Copulation in Domesticated South-American Camelids. *Biol Reprod.* 1991b;45(4):553-9.

Bravo PW, Stewart DR, Lasley BL, Fowler ME. Hormonal indicators of pregnancy in llamas and alpacas. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;208(12):2027-30.

Brown BW. A review on reproduction in South American camelids. *Anim Reprod Sci.* 2000;58(3-4):169-95.

Dionysius DA. Pregnancy Diagnosis in Dairy Goats and Cows Using Progesterone Assay Kits. *Aust Vet J.* 1991;68(1):14-6.

Engelhardt Wv, Höller H. Salivary and gastric physiology of camelids. *Verh Dtsch Zool Ges.* 1982;195-204

Fernandez-Baca S, Hansel W, Novoa C. Corpus luteum function in the alpaca. *Biol Reprod.* 1970a;3(2):252-61.

Fernandez-Baca S, Madden DH, Novoa C. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *J Reprod Fertil.* 1970b;22(2):261-7.

Fowler ME. Evolutionary history and differences between camelids and ruminants. *J Camel Pract Res.* 1997;4(2):99-105.

Fowler ME. General Biology and Evolution. In: Fowler ME, (Hrsg.). *Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuna, Guanaco.* Iowa State University Press; 1998: 1-12.

Fowler ME, Bravo PW. Reproduction. In: Fowler ME, (Hrsg.). *Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuna, Guanaco.* Iowa State University Press; 1998: 381-429.

Gao Y, Short RV, Fletcher TP. Progesterone Concentrations in Plasma, Saliva and Milk of Cows in Different Reproductive States. *Br Vet J.* 1988;144(3):262-8.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Gauly M. Fortpflanzungsphysiologie und Zucht. In: Gauly M, (Hrsg.). Neuweltkameliden. Berlin: Parey Buchverlag; 2002: 76-89.
- Gauly M. Aspects of animal welfare in South American Camelids husbandry. Dtsch Tierärztl Wochenschr. 2004;111(3):127-30.
- Gauly M, Bourke D. [Pregnancy in New World camelids]. Dtsch Tierärztl Wochenschr. 1997;104(1):15-7.
- Gauly M, Egen W, Trah M. The husbandry of South American camelids maintained under middle European conditions. Tierärztl Umsch. 1997;52(6):343-50.
- Goldsmith LT, Lust G, Steinetz BG. Transmission of Relaxin from Lactating Bitches to Their Offspring Via Suckling. Biol Reprod. 1994;50(2):258-65.
- Henderson KM, Camberis M, Simmons MH, Starrs WJ, Hardie AHM. Application of Enzyme-Immunoassay to Measure Estrone Sulfate Concentrations in Cows Milk During Pregnancy. J Steroid Biochem Mol Biol. 1994;50(3-4):189-96.
- Hiendleder S, Kessler M. Zoologie, Domestikation und Verbreitung von Neuweltkameliden. In: Gauly M, (Hrsg.). Neuweltkamliden. Berlin: Parey Buchverlag; 2002: 1-9.
- Karg H. Hormonanalytische Kontrolle von Fortpflanzungsfunktionen. In: Döcke F, (Hrsg.). Veterinärmedizinische Endokrinologie. 3. Aufl. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena; 1994: 766-783.
- Knauf S, Schwalm A, Wehrend A. Physiology of reproduction in domesticated South American camelids. Tierärztl Prax G. 2008;36(5):313-8.
- Marin JC, Zapata B, Gonzalez BA, Bonacic C, Wheeler JC, Casey C et al. Systematics, taxonomy and domestication of alpaca and llama: new chromosomal and molecular evidence. Rev Chil Hist Nat. 2007;80(2):121-40.
- Ohtaki T, Moriyoshi M, Nakada K, Nakao T, Kawata K. Radioimmunoassay of saliva estrone sulfate in pregnant sows. J Vet Med Sci. 1997;59(9):759-63.
- Ortiz C, Caverio J, Sillau H, Cueva S. Parotid saliva of alpaca. Res Vet Sci. 1974;16:54-56
- Pietraszek J, Atkinson S. Concentrations of Estrone Sulfate and Progesterone in Plasma and Saliva, Vaginal Cytology, and Bioelectric Impedance During the Estrous-Cycle of the Hawaiian Monk Seal (*Monachus-Schauinslandi*). Mar Mamm Sci. 1994;10(4):430-41.
- Rahim SEAA. The use of milk progesterone analysis to monitor reproductive activity in the camel (*Camelus dromedarius*). Br Vet J. 1989;145(1):23-7.
- Rahim SEAA, El-Nazier AE. Estimation of progesterone level in camels' (*Camelus dromedarius*) milk and its application in pregnancy diagnosis. Br Vet J. 1987;143(6):555-9.
- Rappersberger G. Einleitung. In: Rappersberger G, (Hrsg.). Lamas und Alpakas. Stuttgart: Ulmer Verlag; 2000: 7-20.

## LITERATURVERZEICHNIS

Steinetz BG, Horton L, Lasano S. The Source and Secretion of Immunoactive Relaxin in Rat Milk. *Exp Biol Med*. 2009;234(5):562-5.

van Dorsser FJD, Swanson WF, Lasano S, Steinetz BG. Development, validation, and application of a urinary relaxin radioimmunoassay for the diagnosis and monitoring of pregnancy in felids. *Biol Reprod*. 2006;74(6):1090-5.

Vaughan JL, Tibary A. Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations. *Small Rumin Res*. 2006;61(2-3):259-81.

Yan WB, Wiley AA, Bathgate RAD, Frankshun AL, Lasano S, Crean BD et al. Expression of LGR7 and LGR8 by neonatal porcine uterine tissues and transmission of milk-borne relaxin into the neonatal circulation by suckling. *Endocrinol*. 2006;147(9):4303-10.

Zdunczyk S, Janowski T, Malecki-Tepicht J. Determination of estrone sulphate in milk for pregnancy diagnosis in cows. *Tierärztl Prax G*. 2002;30(2):75-8.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abstract zu einem Poster, vorgestellt auf der 17. Jahrestagung der DVG-FG InnLab vom 31.01 – 01.02.2009 in Berlin, sowie der 42. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung vom 26.-27.02.2009 in Leipzig

J Volkery, T Wittek, A Sobiraj, J Gottschalk, A Einspanier

#### **Pregnancy diagnosis in New World Camelids using non-invasive methods**

Trächtigkeitsdiagnostik in Neuweltkameliden mittels nicht-invasiver Methoden

Reproduction in Domestic Animals (Supplement 1). 2009;44:39

The husbandry of New World Camelids (NWC), especially of the alpaca, has increased rapidly in Germany. Breeding of NWCs is somehow complex, because the animals show no oestrous cycle and ovulation is induced by coital stimulation. The pregnancy lasts about 350 days with an exceptionally high rate (30-50%) of embryonic losses during the first month of pregnancy, which can further be increased by stress, such as pregnancy diagnosis by blood parameters and ultrasound. Therefore, the aim of this study was to determine a non-invasive, reliable method of pregnancy diagnosis using body fluids which can be taken by the owner himself. For this purpose, samples of blood, saliva and milk of 38 pregnant (p.) and 22 not pregnant (n.p.) mares, verified by ultrasonic investigation, were collected over a period of 18 month. After validation of the analytic methods for the alpaca, the concentrations of progesterone (P4) and relaxin (RLN) were measured. Results show a significant ( $p < 0.05$ ) difference in P4-concentrations in serum (n.p.: mean = 0.25 ng/ml; p.: mean = 2.92 ng/ml) and plasma (n.p.: mean = 0.36 ng/ml; p.: mean = 3.16 ng/ml). There was no significant difference in saliva (n.p.: mean = 2.89 ng/ml; p.: mean = 3.09 ng/ml), whereas first results in milk show a significant difference (n.p.: mean = 0.40 ng/ml, p.:  $> 3$  ng/ml). RLN-concentrations differ significantly in serum (n.p.: mean = 0.76 ng/ml; pr.: mean = 8.02 ng/ml) and plasma (n.p.: mean = 0.78 ng/ml; p.: mean = 4.43 ng/ml), but there was no RLN measurable in saliva. These present results confirm P4 and RLN in blood as a valid marker for pregnancy, whereas saliva does not seem to be reliable.

Milk as a medium seems promising, which needs confirmation by higher sample numbers. *This study was partly supported by AAeV, AZVD and NWK e.V..*

### DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt

- Frau Prof. Dr. A. Einspanier für die nette Betreuung, die fachliche Unterstützung und die vielen motivierenden Anregungen bei der Erstellung dieser Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. A. Sobiraj für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation.
- Herrn Prof. Dr. Thomas Wittek für die fachliche Einführung in das Handling und die Untersuchung von Alpakas, sowie für die vielen Tipps und Anmerkungen beim Durchführen dieser Arbeit.
- Frau Dr. J. Gottschalk und Frau Dipl.-Ing. G. Lochmann für die freundliche Betreuung und die Hilfe bei den labortechnischen Untersuchungen.
- Allen Mitarbeitern/-innen und Doktoranden/-innen des Veterinär-Physiologisch-Chemischen Institutes für Ihre Unterstützung und die tolle Arbeitsatmosphäre.
- Der Alpaka Association (AA e. V.), dem Verein der Züchter, Halter und Freunde von Neuweltkameliden (NWK e. V.) sowie dem Alpaka Zucht Verband Deutschland (AZVD) für die finanzielle Unterstützung.
- Den beteiligten Alpakazüchtern für Ihre Kooperation.
- Herrn Richter aus Leipzig, sowie Herrn JProf. Dr. Uwe Ligges und Frau Ieva Zelo vom SBAZ, TU Dortmund für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.
- Meiner Familie, für Ihre Liebe und Unterstützung.